



Université
de Lille

Université de Lille – Faculté de Médecine

École Doctorale Biologie - Santé

Thèse

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lille

Sciences physico-chimiques et technologies pharmaceutiques

ÉLABORATION D'UN DISPOSITIF MÉDICAL À BASE DE CHITOSAN ET DE POLYMÈRE DE CYCLODEXTRINES POUR LE TRAITEMENT DES INFECTIONS DU PIED DIABÉTIQUE

Présentée et soutenue par

Alice GAUZIT AMIEL

Le 16 décembre 2019

Membres du Jury

Dr. Véronique BONNET	Université de Picardie – Jules Verne	Rapporteur
Pr. Sophie GIROD-FULLANA	Institut Carnot Chimie Balard Cirimat	Rapporteur
Pr. Jean-Philippe LAVIGNE	Université de Montpellier	Examineur
Pr. Bernard MARTEL	Université de Lille	Examineur
Dr. Laurent RASKINE	Hôpital Lariboisière	Examineur
Dr. Christel NEUT	Université de Lille	Invité
Dr. Nicolas BLANCHEMAIN	Université de Lille	Directeur de thèse
Pr. Benoit FOLIGNÉ	Université de Lille	Co-Directeur

"Vis comme si tu devais mourir demain. Apprends comme si tu devais vivre toujours"
Mahanda Karamchand Ganghi

À la mémoire de mon grand-père le Pr. Claude Amiel

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'unité INSERM U1008 « Controlled Drug delivery Systems and Biomaterials » de l'université de Lille.

Je tiens à remercier le **Pr. Juerguen SIEPMANN**, directeur de l'U1008, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

J'exprime toute ma gratitude au **Dr. Véronique BONNET**, chargée de recherche à l'Université de Picardie-Jules Verne et au **Pr. Sophie GIROD-FULLANA**, Professeur à l'Institut Carnot Chimie Balard, d'avoir accepté de juger ce travail. Mes sincères remerciements au **Pr. Jean-Philippe LAVIGNE** de la Faculté de Nîmes et au **Dr. Laurent RASKINE** de l'hôpital Lariboisière de Paris, d'avoir accepté d'examiner mes travaux de thèse.

Je tiens à remercier sincèrement mon directeur de thèse le **Dr. Nicolas BLANCHEMAIN** pour m'avoir accueillie dans son équipe et qui, grâce à son encadrement et ses conseils scientifiques m'a permis de grandir scientifiquement et humainement. Un grand merci Nicolas pour ton optimisme communicatif qui m'a donné la motivation d'avancer dans les moments de découragement et pour ton aide précieuse dans les derniers temps de rédaction.

Mes sincères remerciements vont également à mon co-directeur de thèse le **Pr. Benoit FOLIGNÉ** qui m'a accompagné de loin mais qui a toujours eu un mot d'encouragement lors nos rencontres.

Un grand merci au **Pr. Bernard Martel** de m'avoir ouvert les portes de l'UMET où j'ai préparé mes éponges et réalisé les caractérisations physico-chimiques. Je tiens à profondément vous remercier pour vos conseils scientifiques et votre rigueur qui ont amélioré mes connaissances scientifiques, et pour votre patience et votre disponibilité lors de la rédaction du manuscrit de thèse.

Je tiens également à remercier le **Dr. Feng HILDEBRAND** pour sa disponibilité, son expertise concernant la caractérisation biologique et en micro-CT.

Mes sincères remerciements vont également au **Dr. Christel NEUT** et à toute l'équipe du laboratoire de bactériologie de m'avoir accueillie pour la réalisation des évaluations microbiologiques, pour vos conseils précieux et votre disponibilité.

Je n'oublie pas de remercier le **Dr. Joël LYSKAWA** de m'avoir permis d'utiliser le lyophilisateur pour la préparation des éponges. Merci également au **Dr. Nicolas TABARY** et à **Jean-Noël STAELENS** de m'avoir rendu tant de fois service lorsqu'il fallait lancer et arrêter la lyophilisation. Merci aussi au **Dr. Jean-François Willart** de m'avoir laissé utiliser le co-broyeur et au **Dr. Frédéric CAZAUX** pour son expertise en rhéologie.

Je souhaite remercier le **Pr. Stéphane HAULON** qui est à l'origine de ma rencontre avec **Dr. Nicolas BLANCHEMAIN** et tout ce qui en a découlé...

Un grand merci au **Dr. Marco LOPEZ** pour avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions, pour ses conseils et son humour très particulier pas toujours accessible au commun des mortels. À tous les collègues thésards et amis du laboratoire **Maria, Alej, Carla, Syrine, Justine, Erol, Henry, Marion, Adrien, Clémence, Clémentine** et **Victor** pour tous les bons moments passés ensemble, la bonne ambiance, et les sorties labo. Une mention particulière pour ma stagiaire **Donia** qui a accompli une charge de travail énorme pour finir les manips au plus vite. Sans toi je n'y serais pas arrivée.

Un remerciement tout particulier à mon amant diabolique « **Sir** » **Mickaël Maton** pour avoir partagé mes délires, pour ta gentillesse démesurée, ton amitié, pour ne pas m'en vouloir d'avoir gâché quelques heures de tes week-end et de ton précieux soutien quand je n'y comprenais rien.

Je voudrais tout particulièrement remercier mon amie « pour la vie » **Dyhia**. Cette thèse n'aurait pas eu la même saveur sans toi, tu y as apporté ton piquant, tes touches d'acidité et tes petites pointes de sucré. Tu as aussi été, quand il le fallait ma boisson énergisante pour

me booster et ma verveine du soir pour m'apaiser. Et parce que nous avons toujours très faim, nous ne savons que trop bien que toutes ces épices sont essentielles.

Merci aussi à tous mes meilleurs amis : **Clem, Anne-So, Bapt, JA, Guillaume, Alice** et les autres qui n'ont toujours pas compris mon parcours scolaire et qui ne manquent pas de me rappeler qu'il faut arrêter d'étudier et commencer à travailler. **Lucas** et **Maram**, merci pour ces doux moments de relaxation hors de ma tanière. Mention spéciale pour **Juju**, mon nègre officiel... **Edweirdo**, obrigado pour ta gentillesse, ta weirdness, les gif d'encouragements et les discussions sur la vie. **Leora**, mon nouveau rayon de soleil, ta folie a su égayer mes journées, parfois même un peu trop quand je devais travailler.

Je n'ai pas de mots pour remercier mes parents d'avoir toujours été là pour moi, d'avoir cru en moi, et de m'avoir poussé toujours plus loin. **Zaza**, merci de tous ces moments partagés ensemble, les voyages, les expo, les resto, les joies et même les moments les plus difficiles. **Papa**, merci pour ton soutien, les rando et le partage du compte eurosport pour suivre les compétitions de ski. Ma **Florette**, mon petit totoro, je suis fière d'être ta sœur.

Table des matières

REMERCIEMENTS	5
Principales abréviations	13
Introduction générale.....	17
Chapitre 1 : Étude bibliographique	3
1. Insuline, diabète et complications.....	5
1.1. Physiologie de la sécrétion de l'insuline	5
1.2. Fonctions de l'insuline	6
1.3. Le diabète	6
1.4. Les complications liées au diabète	8
1.4.1. L'infection du pied diabétique (DFI : « diabetic foot infection »)	9
1.5. Conclusion	18
2. Les systèmes à libération locale	19
2.1. Les pansements	19
2.1.1. Les pansements pro-cicatrisants.....	21
2.1.2. Pansements antibactériens	23
2.2. Les systèmes à libération locale pour les infections profondes du pied diabétique	26
2.2.1. Le polyméthacrylate de méthyle (PMMA)	26
2.2.2. Le sulfate de calcium purifié (CaSO ₄)	27
2.2.3. Les éponges de collagène	28
2.3. Conclusion	28
3. Les hydrogels et éponges	30
3.1. Les hydrogels	30
3.1.1. Caractérisation rhéologique des hydrogels	31
3.1.2. Les hydrogels à base de polymères naturels	32
3.2. Les éponges	45
3.2.1. La lyophilisation	47
3.2.2. Caractérisation des éponges	50
3.2.3. Les éponges de chitosan à libération d'antibiotiques.....	53

3.3.	Les travaux du laboratoire à base du mélange de CHT et de PCD.....	56
3.4.	Conclusion	58
4.	Contexte, objectifs de la thèse et cahier des charges.....	60
4.1.	Contexte et objectifs de la thèse	60
4.2.	Cahier des charges	61
	Chapitre 2 : Matériels et Méthodes	64
1.	Matériels.....	66
1.1.	Le chitosan (CHT)	66
1.2.	Le polymère de cyclodextrines soluble (PCD)	66
1.3.	La ciprofloxacine (CIP).....	67
1.4.	La rifampicine (RFP)	67
2.	Méthodes	68
2.1.	Préparation des hydrogels lyophilisés de CHT et de PCD	68
2.2.	Préparation des hydrogels lyophilisés	68
2.3.	Caractérisation des hydrogels	69
2.3.1.	Test du flacon retourné.....	69
2.3.2.	Étude rhéologique.....	70
2.4.	Caractérisation des éponges	71
2.4.1.	Étude de la microstructure par MEB (Microscopie Électronique à Balayage)	71
2.4.2.	Étude de la dégradation.....	71
2.4.3.	Étude du gonflement	72
2.4.4.	Essais mécaniques.....	73
2.5.	Étude des cinétiques d'absorption et de libération des éponges imprégnées	73
2.5.1.	Cinétique d'absorption	73
2.5.2.	Libération en condition dynamique.....	74
2.6.	Tests biologiques	75
2.6.1.	Étude de la cytotoxicité – méthode de l'extrait (contact indirect)	75
2.6.2.	Évaluation de l'activité antibactérienne	77
2.7.	Analyses statistiques.....	81
	Chapitre 3 : Résultats et Discussion	82

Partie 1 : Conception et caractérisation des éponges.....	84
1. Préparation et caractérisation des hydrogels.....	84
1.1. Observation macroscopique des hydrogels	84
1.2. Analyse rhéologique	85
2. Caractérisation des éponges.....	89
2.1. Observations macroscopiques des éponges	89
2.2. Observations microscopiques de la microarchitecture des éponges	91
2.3. Évaluation de la dégradation des éponges	92
2.4. Gonflement des éponges	95
2.5. Propriétés mécaniques des éponges	97
2.6. Évaluation de la cytotoxicité des éponges	100
3. Conclusion	101
Partie 2 : Étude in vitro du chargement et de la libération des principes actifs.....	103
1. Étude des paramètres de chargement des principes actifs	103
1.1. Interactions CD/antibiotiques	103
1.2. Influence du temps de chargement	105
1.2.1. Chargement de la ciprofloxacine	105
1.2.2. Chargement de la rifampicine.....	110
1.2.3. Conclusion.....	113
2. Étude de la libération des principes actifs en mode dynamique.....	114
2.1. Étude de la libération de la ciprofloxacine.....	114
2.2. Étude de la libération de la rifampicine	117
3. Conclusion	121
Partie 3 : Étude in vitro de l'activité des éponges chargées d'antibiotiques.....	122
3.1. Test de diffusion	122
3.1.1. Éponges chargées avec la ciprofloxacine	122
3.1.2. Éponges chargées avec la rifampicine	125
3.1.3. Éponges chargées avec l'association ciprofloxacine-rifampicine.....	128
3.2. Test de la réduction bactérienne (Kill Time)	131

3.2.1. Éponges chargées avec ciprofloxacine.....	131
3.2.2. Éponges chargées avec la rifampicine	134
3.2.3. Éponges chargées avec l'association de ciprofloxacine/rifampicine	136
3.3. Conclusion	138
Chapitre 4 : Conclusions et perspectives	141
Conclusion et discussion générale.....	143
Perspectives	150
Références bibliographiques	153
Communications	183
Résumé	187
Abstract	187

Principales abréviations

ATB	Antibiotique
CD	Cyclodextrine
CHT	Chitosan
CIP	Ciprofloxacine
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DT1	Diabète de type 1 insulino-dépendant
DT2	Diabète de type 2 non insulino-dépendant
DFI	Infection du pied diabétique (« diabetic foot infection »)
DFO	Ostéite du pied diabétique (« diabetic foot osteomyelitis »)
G'	Module de conservation
G''	Module de perte
MHA	Muller Hinton agar
NTT	Non traité thermiquement
PBS	Phosphate buffer saline
PCD	Polymère de cyclodextrine
PEC	Complexe de polyélectrolyte (« polyelectrolyte complex »)
RFP	Rifampicine
TT	Traité thermiquement

Introduction générale

Le diabète touche 425 millions de personnes dans le monde d'après la fédération internationale du diabète. Sa progression est particulièrement importante, notamment en Afrique. Les pays en voie de développement sont, eux, sujets à un exode rural qui génère des centaines de milliers de citadins. Ils vivent de manière sédentaire avec une rupture soudaine de leur mode d'alimentation, et une consommation brutale de produits industriels trop gras et trop riches en glucides. De plus, cette situation est aggravée par les inégalités d'accès aux traitements. Le diabète est accompagné de nombreuses complications, dont l'infection du pied diabétique. Cette infection est la cause d'hospitalisation la plus fréquente des patients, et aussi la première cause d'amputation des extrémités. Elle résulte de plusieurs complications liées à l'hyperglycémie chronique. Les patients diabétiques sont généralement immunodéprimés et atteints de neuropathies et d'insuffisances vasculaires périphériques qui sont favorables à une colonisation bactérienne. Leur prise en charge est multidisciplinaire, longue et coûteuse. L'infection du pied diabétique est particulièrement handicapante physiquement et psychologiquement pour les patients dont les plaies sont mises en décharge pendant de longues périodes. Lorsqu'elle est installée, son éradication est particulièrement difficile. La mauvaise perfusion du site infecté empêche les cellules de l'immunité comme les antibiotiques d'atteindre leur cible. Les bactéries sont particulièrement résistantes aux antibiotiques et sont capables de former des biofilms qui diminuent la diffusion des médicaments. L'antibiothérapie n'est donc pas toujours efficace d'où un risque majeur de récurrence et d'amputation. Dans ce contexte, la société scientifique s'efforce de trouver de nouveaux traitements notamment par la libération locale d'antibiotique est au cœur de la recherche depuis plusieurs années. Elle présente l'avantage de pouvoir libérer des doses plus importantes à un site spécifique, sans passage par la voie générale. Malgré l'avasclérisation, on peut ainsi augmenter les concentrations locales sans risques de toxicité secondaire ou de passage hépatique. La quantité d'antibiotiques libérée devient alors suffisante pour pénétrer le biofilm et éliminer les pathogènes.

L'objectif de ce travail de thèse est de développer un dispositif médical qui libère des antibiotiques localement pour le traitement des infections du pied diabétique. Le support se présente sous la forme d'un hydrogel lyophilisé *i.e* éponge de chitosan et de polymère de cyclodextrines. Ces deux polymères chargés respectivement positivement et négativement,

sont capables de former des complexes polyélectrolytes. Notre groupe de recherche, en collaboration avec l'UMET-ISP, travaille depuis plusieurs années sur les systèmes polyélectrolytes à base de chitosan et des polymères de cyclodextrines pour la fabrication d'hydrogels, de nanofibres, et de revêtement multicouche pour concevoir des pansements. Les avantages d'une éponge sont sa taille et sa forme facilement modulables à tous les types de plaies. Ce dispositif est aussi très simple d'utilisation, car il peut être imprégné par les professionnels de santé avec une solution d'antibiotiques (selon les besoins) juste avant la mise en place chez un patient.

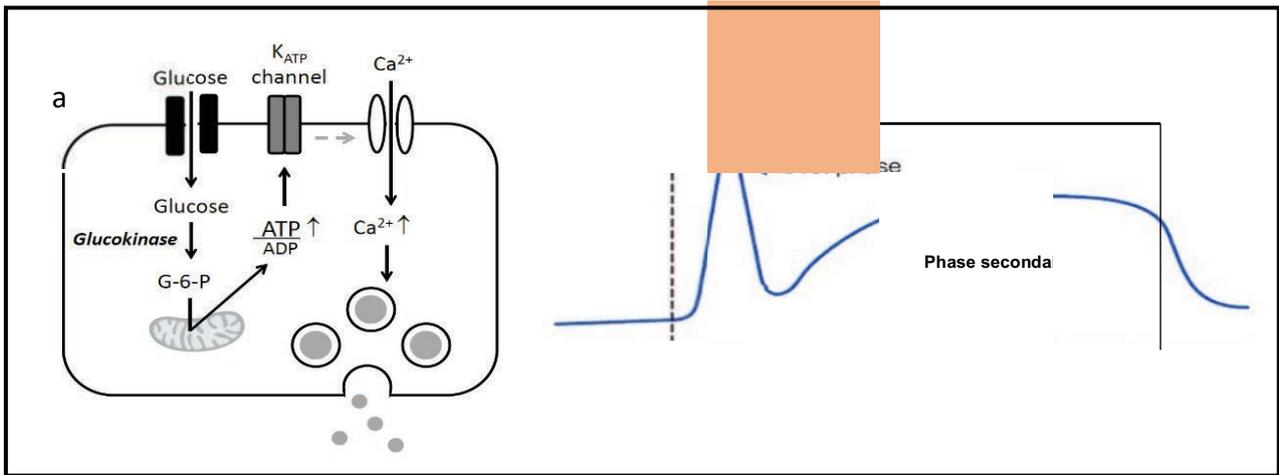
Le manuscrit de thèse est organisé en quatre chapitres. Le premier chapitre est une étude bibliographique qui permet de poser la problématique des infections du pied diabétique et les différentes options de traitement qui existent aujourd'hui. Une sous partie est ensuite consacrée aux hydrogels, leurs nature et moyens d'obtention. Plus particulièrement, les polyélectrolytes de chitosan et de polymère de cyclodextrine y sont présentés et discutés au regard de cette utilisation. Cette partie se termine par le développement des éponges, leurs techniques de fabrication, et notamment la lyophilisation. Le deuxième chapitre présente les polymères et produits utilisés pour la conception des éponges, les molécules pharmacologiques utilisées et les méthodes développées pour leur évaluation. Le troisième chapitre regroupe les résultats et leur discussion en trois parties. La première concerne la conception des éponges et leur caractérisation physico-chimique. La seconde est une étude de la libération de plusieurs antibiotiques seuls (ciprofloxacine et rifampicine) ou en association. La troisième traite de l'évaluation microbiologique des éponges imprégnées des antibiotiques. Le dernier chapitre permet de conclure sur les résultats et de proposer des perspectives pour la suite du travail.

Chapitre 1 : Étude bibliographique

1. Insuline, diabète et complications

1.1. Physiologie de la sécrétion de l'insuline

Le pancréas est une glande à 95% exocrine et 2% endocrine. Sa partie endocrine qui est organisée en îlots de Langerhans, produit et sécrète les hormones nécessaires à la régulation du glucose sanguin. Leur rôle a été découvert en 1890 par Joseph van Mering et *al.* qui, à la suite de pancréatectomies, ont montré le développement de diabète chez le chien (1). Les îlots sont constitués de 5 types cellulaires : les cellules α (glucagon), β (insuline and amylin), δ (somatostatine), ϵ (ghrelin) et les cellules PP (polypeptide pancréatique). Les cellules β productrices de l'insuline sont les plus nombreuses ; elles représentent 50 à 70% de la masse des îlots. La communauté scientifique a montré que l'insulino-sécrétion n'est pas réduite à ces seuls types cellulaires mais à l'interaction de l'ensemble des constituants des îlots pancréatiques. Ils interagissent par contact direct ou par l'intermédiaire des produits sécrétés. Le glucose est l'agent stimulant le plus puissant de la sécrétion de l'insuline. Il pénètre via son transporteur GLUT-2 dans les cellules β où il est phosphorylé par une glucokinase en glucose-6-phosphate (glycolyse) (Figure 1). La phosphorylation entraîne une augmentation de la production d'ATP, par le cycle de Krebs, qui provoque une fermeture des canaux K^+ /ATP dépendants. La membrane cellulaire se dépolarise et permet au Ca^{2+} extracellulaire de pénétrer dans la cellule par ses canaux voltage dépendant ouverts. L'augmentation du Ca^{2+} cytosolique est nécessaire à l'exocytose des vésicules d'insuline. Après un bolus de glucose, la sécrétion d'insuline est bi-phasique (Figure 1). La première phase, très courte, débute moins d'une minute après l'ingestion du glucose. Elle correspond à la sécrétion de l'insuline stockée dans les granules de sécrétion. Son intensité dépend de la glycémie. Des études ont montré que la disparition de cette phase est associée au développement des diabètes de type 1 et 2. S'ensuit une deuxième phase soutenue qui débute quelques minutes après le bolus mais n'est mise en évidence qu'au bout de 10 min, et dure le temps de l'homéostasie. L'insuline libérée est celle déjà stockée mais également celle nouvellement synthétisée (2)(3)(4)(5). Les lipides, les acides aminés et les hormones intestinales incrétines (GIP et GLP-1) jouent également un rôle dans la sécrétion de l'insuline (3)(6).



(a) Mécanisme de la sécrétion d'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans (3) ; (b) Stimulation bi-phasique de l'insuline par une élévation du glucose sanguin d'après (4)

1.2. Fonctions de l'insuline

L'insuline permet le maintien du taux de glucose sanguin dans les normes physiologiques (3,9-5,5 mmol/L ou 0,7-1 g/L) malgré les variations en apport et en dépense énergétique journaliers. Cette hormone, grâce à ses propriétés catabolisante et anabolisante contrôle le métabolisme des carbohydrates, des lipides et des protéines. Après un repas, elle favorise la synthèse du glycogène hépatique et musculaire et inhibe la glycogénolyse et la néoglucogénèse. On observe également une augmentation de la synthèse des triglycérides et une diminution de la transformation des acides gras en acides aminés et cétoniques par le foie. La synthèse protéique est stimulée dans les cellules des muscles squelettiques. Dans les adipocytes, l'insuline favorise une accumulation des réserves énergétiques via la lipogénèse. Au niveau du cerveau, le glucose est transformé en énergie sous forme d'ATP. L'insuline permet ainsi de stocker l'énergie nécessaire aux besoins des tissus (3)(4)(7).

Une sécrétion et/ou une action insuffisante de l'insuline sont responsables du développement de maladies métaboliques. Le diabète est la plus connue.

1.3. Le diabète

Le diabète est un désordre métabolique caractérisé par une hyperglycémie résultant d'un manque d'insuline, d'un défaut de son fonctionnement ou des deux (8)(9)(10)(11). Il est défini

par une glycémie à jeun (8h) > 1,26 g/L (7,0 mmol/L) à deux reprises et/ou la présence de symptômes de diabète (polyurie, polydipsie, amaigrissement) associée à une glycémie (sur plasma veineux) \geq 2 g/L (11,1 mmol/L) et/ou une glycémie (sur plasma veineux) \geq 2 g/L (11,1 mmol/L) 2 h après une charge orale de 75 g de glucose (9)(11). La prévalence du diabète dans le monde évolue vers un niveau épidémique alarmant. En 2017, 425 millions d'adultes (20-79 ans) étaient atteints contre 108 millions en 1980 (12). La fédération internationale du diabète (IDF) prévoit une augmentation jusqu'à 629 millions de malades en 2045. Cette affection cause 4 millions de morts par an (10,7 % de la mortalité) et a coûté 727 billions de dollars en 2017 (soit 12% du coût total des soins pour les adultes) (13). Elle est majoritairement retrouvée dans les pays à revenu faible/intermédiaire (80 % des diabétiques) (14). Il existe plusieurs types de diabète qui se différencient selon leur étiologie et les signes cliniques qui les accompagnent. La classification la plus habituelle les sépare en 4 groupes : le type 1 ou insulino-dépendant (DT1), le type 2 ou non insulino-dépendant (DT2), le diabète gestationnel et les autres diabètes spécifiques (10).

Le DT1 correspond à une carence en insuline. Elle survient après la destruction des cellules β du pancréas, principalement par les lymphocytes T inflammatoires, B humoraux et les macrophages (15). Dans la plupart des cas ce diabète est auto-immun. Il représente 5 à 10 % des personnes diagnostiqués diabétiques (10). Les causes sont encore inconnues, mais seraient multifactorielles (génétiques et environnementales) (16)(17). Le traitement du DT1 est une supplémentation exogène en insuline.

Le DT2 est lié à une insulino-résistance dominante avec une insulino-pénie relative, ou à une diminution prédominante de l'insulino-sécrétion associée ou non à une insulino-résistance (18). C'est le type de diabète le plus fréquent (90 à 95 % des cas (10)(19)). Il est le résultat de facteurs génétiques et environnementaux comme l'urbanisation des populations associée à une modification de leur mode de vie (16). La surcharge pondérale et surtout l'obésité androïde jouent un rôle majeur dans la genèse de l'insulino-résistance (20). La déposition ectopique d'acide gras dans le foie, les muscles et les adipocytes pourrait être à l'origine d'un défaut de signalisation de l'insuline ou d'une résistance empêchant la bonne internalisation du glucose (21). Il a aussi été montré que chez les sujets obèses ayant un DT2, le nombre de cellule β est diminué, entraînant une diminution de la sécrétion d'insuline (22). Le traitement est médicamenteux en mono, bi ou trithérapie (biguanides, sulfamides, glinides,

inhibiteurs des α glucosidase et glitazones). En cas d'échec thérapeutique on instaure une insulinothérapie.

1.4. Les complications liées au diabète

Elles représentent la menace la plus grave pour les personnes vivant avec un diabète et peuvent être séparées en 2 groupes Figure 2. L'atteinte des petites artères ou micro-angiopathie est principalement due à l'hyperglycémie chronique qui engendre des dommages irréversibles et des dysfonctionnements au niveau des yeux, des reins, des nerfs et des os. L'atteinte des grosses artères ou macro-angiopathie est liée à la formation de plaques d'athérome entraînant un rétrécissement de la lumière des vaisseaux. Pour un diabétique le risque de développer des maladies cardiovasculaires est 2 à 4 fois plus élevé, et 3 fois plus mortel que pour sujet sain. Elles sont la principale cause de morbi-mortalité (16).

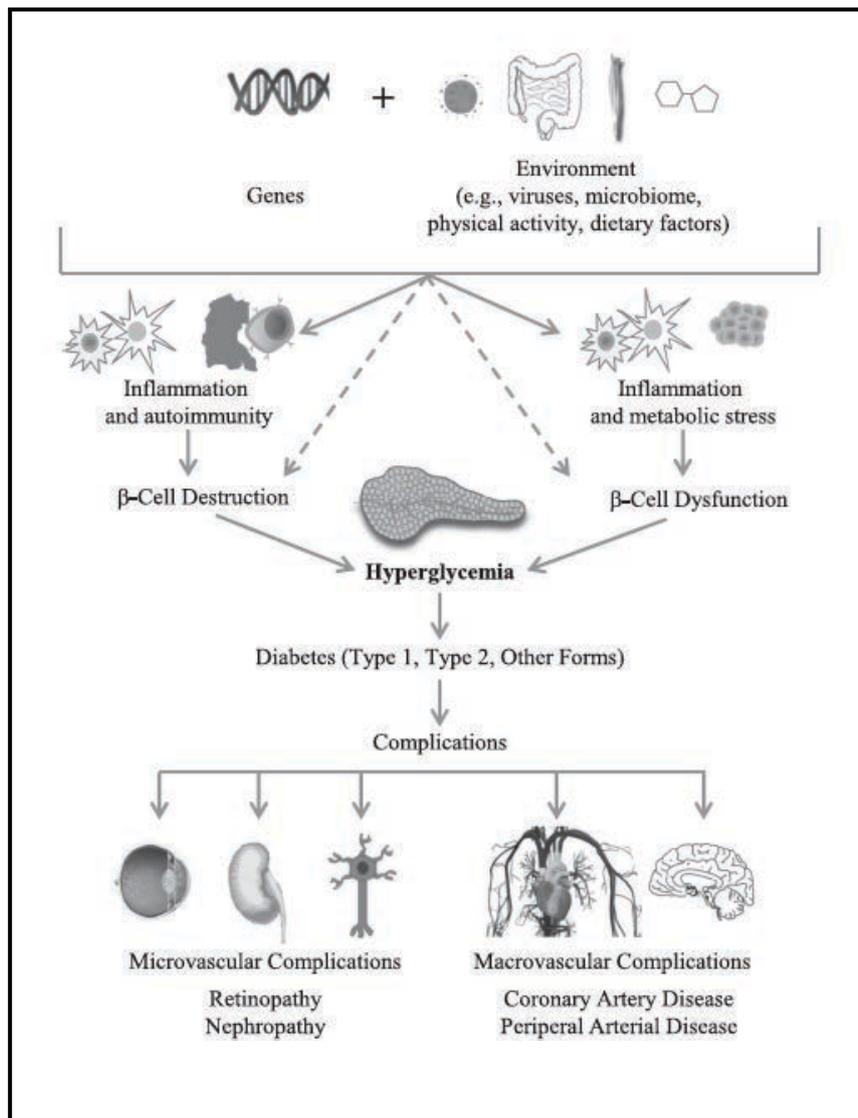


Figure 2 : Origines de l'hyperglycémie et ses principales complications (16)

1.4.1. L'infection du pied diabétique (DFI : « diabetic foot infection »)

La DFI est la complication diabétique la plus fréquente nécessitant une hospitalisation et l'évènement le plus à risque d'amputation des extrémités (23)(24). Ces infections ont une incidence de 4 à 15 % chez les diabétiques avec un risque d'amputation pouvant être supérieur à 50 % (25)(26). Elles sont associées à une morbi-mortalité élevée, une diminution de la qualité de vie physique et mentale des patients, et une prise en charge lourde et longue (soins, antibiothérapie, chirurgie) (23)(27). Leur prévalence et les dépenses qu'elles engendrent en font désormais un problème de santé publique.

1.4.1.1. Physiopathologie

Ces infections surviennent dans un contexte de diabète de longue date et sont la conséquence de plusieurs complications (Figure 3). La porte d'entrée à la colonisation bactérienne peut être un traumatisme, notamment un ulcère, qui rompt la barrière cutanée (Figure 4) (25)(27)(28). Les tissus sont alors exposés aux micro-organismes pathogènes et l'infection se manifeste sous la forme d'une dermohypodermite, d'un ulcère infecté et ou d'une atteinte osseuse (25). L'infection peut aussi se manifester à la suite d'une translocation de bactéries d'origine digestive (29). Cette translocation peut être la conséquence de l'immunodépression. La survie des anaérobies digestives peut être favorisée par l'angiopathie responsable d'une oxygénation diminuée.

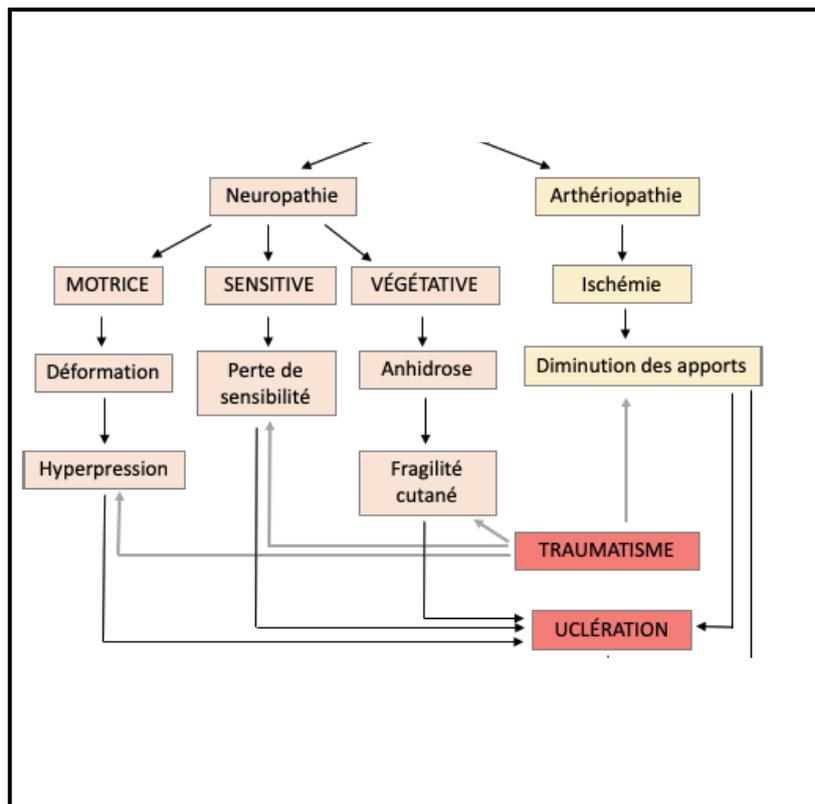


Figure 3 : Physiopathologie de l'ulcération diabétique à risque infectieux (30)

La majorité des infections se déclarent chez des patients présentant des pieds neuropathiques. Les dommages neurologiques liés à l'hyperglycémie chronique sont mixtes. L'atteinte sensitive entraîne une perte de la sensibilité thermo-algique et proprioceptive. Les

troubles moteurs modifient l'architecture du pied, de la marche et des points d'appuis. L'altération végétative diminue la sudation responsable d'une sécheresse cutanée qui favorise le développement d'une hyperkératose et de fissures. L'existence de ces polyneuropathies a pour conséquence une augmentation des pressions plantaires, des zones de frottements, du temps de contact pied/sol et du risque de lésions qui passent inaperçue, aboutissant à un ulcère (25)(26)(27).

Les artériopathies fragilisent les tissus et empêchent les apports sanguins nécessaires à la cicatrisation. Un diabétique est trois fois plus à risque de développer une athérosclérose. Elle se développe dans un environnement hyperglycémique mais est aussi liée à d'autres facteurs de risques non négligeables tels que la dyslipidémie, l'obésité, le tabagisme et les antécédents familiaux. Les altérations métaboliques et hémodynamiques entraînent une augmentation de la paroi et une sclérose des vaisseaux. L'ensemble favorise l'ulcération et le risque infectieux (25)(26)(27).

Les DFIs surviennent également sur un terrain immunitaire fragilisé. La réponse inflammatoire de ces patients est anormale est liée à une altération de la fonction des leucocytes, de la morphologie des macrophages, du nombre de cytokines pro-inflammatoires et une déficience en polynucléaires neutrophiles (27).

L'hyperglycémie facilite directement le développement de micro-organismes pathogènes et accroît la virulence de certains. Elle entraîne une diminution des capacités de cicatrisation qui avec la privation d'insuline donnent un avantage aux pathogènes agressifs et augmente donc le risque infectieux (27).

Finalement l'architecture compartimentée et interconnectée du pied est elle-même est un facteur supplémentaire pour la propagation d'une infection (23)(27).

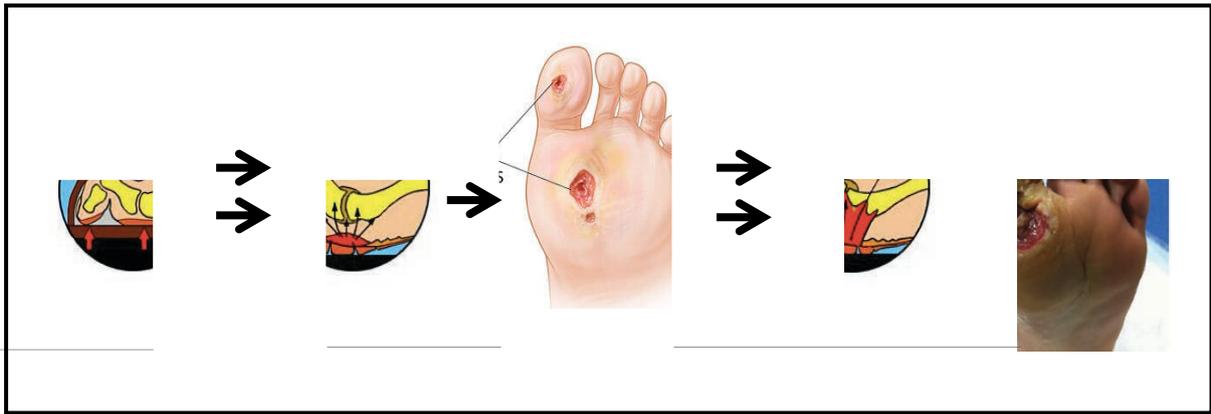


Figure 4 : Le pied diabétique : ses traumatismes et portes d'entrée à l'infection (31)(32)(33)

1.4.1.2. Classification

Toute plaie sur le pied d'un patient diabétique doit faire rechercher une infection. Le patient doit être adressé à une équipe pluridisciplinaire et préférentiellement dans un centre spécialisé. La prise en charge se fait dans l'urgence, pour une mise en place rapide du traitement, et éviter l'aggravation des plaies (30). Il existe des classifications internationales pour la prise en charge des DFIs, éditées entre autres par l'IWGDF (International Working Group on the Diabetic Foot) et l'IDSA (Infectious Diseases Society of America). Elles décrivent les stades et sévérités de l'infection (Tableau 1) (23)(25). Le classement de l'IDSA a été validé comme outil de prédiction de l'évolution de ces infections et du risque d'amputation des membres inférieurs (3% en cas d'infections légères, 46 % pour les formes modérées, dont les ostéites et 70 % pour une infection sévère) (25).

Tableau 1 : Classification des infections du pied diabétique selon l'IWGF et l'IDSA (*SRIS : syndrome de réponse inflammatoire systémique) (23)

Symptomatologie de l'infection	Stade selon l'IWGF	Sévérité selon l'IDSA
Aucun symptôme ou signe d'infection	1	Absence d'infection
<ul style="list-style-type: none"> Infections locales de la peau ou du tissu sous-cutané, érythème > 0,5 cm ou ≤ 2 cm autour de l'ulcère Exclusion des diagnostics différentiels d'inflammation (ex : traumatisme, goutte, pied de Charcot, thrombose, insuffisance veineuse, fracture) 	2	Légère
Infections locales avec érythème > 2 cm ou des structures au-delà des tissus sous-cutanés (abcès, fasciite, ostéite, arthrite septique) et absence de signes de SIRS*	3	Modérée
Infection locale avec signes de SIRS *: <ul style="list-style-type: none"> Température > 38 ou < 36 °C Fréquence cardiaque > 90/min Fréquence respiratoire > 20/min Leucocytes > 12 G/L ou > 4 G/L ou > 10 % neutrophiles non segmentés 	4	Sévère

L'ostéite du pied diabétique (DFO : « diabetic foot osteomyelitis ») est une infection de l'os ou des structures articulaires en dessous de la malléole chez un patient diabétique avec un pied à risque (34). Le plus souvent elle est secondaire à une infection des tissus mous. Par contiguïté, l'infection gagne l'os cortical compact puis l'os médullaire spongieux (ostéomyélite) (33)(34). Toute lésion large et profonde et en particulier si elle est chronique malgré le traitement bien conduit, doit faire suspecter une infection osseuse. Elle doit aussi être évoquée devant un ou plusieurs doigts de pied rouges et gonflés (doigt saucisse) (24)(33). Les DFOs sont associées à une augmentation des coûts d'hospitalisation et d'exams, des

traitements prolongés et un risque majoré de rechute et d'amputation (24)(33). Elles sont particulièrement difficiles à traiter en raison de la faible pénétrance des antibiotiques au site infecté. En effet, l'os est un organe à faible débit sanguin et entouré de tissus morts non vascularisés dans ce type de plaies ; elles sont de plus aggravées par les insuffisances vasculaires dont souffrent les diabétiques. Les principes actifs et cellules du système immunitaire ne peuvent donc pas atteindre la zone infectée avascularisée (35). Les bactéries sont donc en contact avec une concentration en antibiotique inférieure à la CMI (concentration minimale inhibitrice), ce qui favorise indirectement le développement de résistances. Les thérapies conventionnelles sont alors inefficaces.

1.4.1.3. Microbiologie des DFIs

Les DFIs sont principalement causées par des cocci Gram+ aérobies et en particulier par *Staphylococcus aureus* (23)(24)(25). Ses propriétés spécifiques en font un micro-organisme particulièrement virulent. Ses adhésines lui permettent un bon attachement aux protéines de la matrice extracellulaire ; certains composants favorisent son éviction des défenses de l'hôte et une bonne pénétrance cellulaire, en particulier chez les mammifères (36). On retrouve plus rarement des streptocoques bêta-hémolytique (surtout du groupe B) et des staphylocoques à coagulase négative. Les infections des plaies récentes (moins de 15 jours) et superficielles sont le plus souvent d'origine monomicrobiennes. Les formes modérées à sévères et chroniques, qui ont déjà été traitées, sont plus souvent polymicrobiennes, avec des coques Gram+, des entérobactéries (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* spp), des bacilles Gram- pyogènes (*Pseudomonas aeruginosa*) et des bactéries anaérobies obligatoires (24)(25)(30). Dans les prélèvements osseux issus de DFOs, l'agent pathogène le plus fréquemment retrouvé est *S. aureus* seul, ou prédominant dans le cadre d'une infection polymicrobienne (24)(25). Des études récentes ont montré que dans les régions subtropicales et chaudes, les infections aux entérobactéries et à *P. aeruginosa* sont les plus fréquentes (30% de *S. aureus* contre 75 % sous nos latitudes) (25)(34). La littérature recense quelques rares cas d'infections fongiques, parasitaires, ou à mycobactéries. En revanche, les infections virales osseuses n'ont pas encore été décrites. L'isolement de plus en plus fréquent de bactéries multi-résistantes est un problème récent. Depuis 10 ans, on assiste à l'émergence de *S. aureus*

résistant à la méticilline (SARM) et de bactéries Gram- bêtalactamase à spectre élargi ou productrices de carbapénémase (24)(25). Le biofilm est un autre grand mécanisme de résistance responsable d'échecs thérapeutiques. On le retrouve dans la plupart des plaies chroniques (dont les DFOs) (37)(38). Une étude récente confirme la présence de biofilm dans des ulcères infectés aigus ou chroniques du pied diabétique (39). L'os dévascularisé des DFIs est un substrat idéal pour l'attachement des bactéries qui s'organisent en communauté pour développer le biofilm (40). Il a été découvert en 1970 par le Dr William Costerton qui a démontré le changement des pathogènes de la forme familière planctonique (flottante) à la forme sessile (adhérente) phénotypiquement différente, par fixation à une surface (35). Plusieurs étapes sont nécessaires à sa formation comme illustré Figure 5. Les pathogènes adhèrent à la surface de façon réversible via des liaisons chimiques ; de par la formation de molécules protéiques et de structures (pili), l'adhésion devient permanente. Après fixation, les colonies formées par multiplication des bactéries sécrètent la matrice. C'est un polymère extracellulaire dont la composition varie selon les espèces bactériennes. Le biofilm évolue en écosystème par la maturation de cette matrice qui s'épaissit, la formation de canaux reliant les colonies et l'envoi de signaux de communication (quorum sensing (36)(41)). La maturation est suivie par la phase planctonique pendant laquelle les bactéries se détachent et colonisent de nouvelles zones (41)(40). Les biofilms sont une communauté dynamique en changement constant, composés parfois d'une seule espèce de bactérie ou de champignon, ou plus fréquemment d'origine polymicrobienne. Ils protègent les micro-organismes d'agressions extérieures comme les antibiotiques et les mécanismes de défenses de l'hôte en empêchant leur diffusion par diminution du métabolisme et des changements phénotypiques (42). Le stress mécanique tel que le débridement est limité en raison de l'extrême rapidité de la formation/reformation de cette barrière (36)(41)(43). Pour éliminer le biofilm et ses pathogènes, il faut des concentrations en antibiotiques très élevées (10-1000 fois la concentration minimale inhibitrice) sur des périodes prolongées, qui peuvent entraîner des effets secondaires toxiques et délétères pour le patient (35)(38)(44). De plus, la plupart des antibiotiques inhibent la division cellulaire ou la synthèse de la paroi bactérienne (45). Or, dans les biofilms, les bactéries sont en état de quiescence, les médicaments ne peuvent donc pas agir.

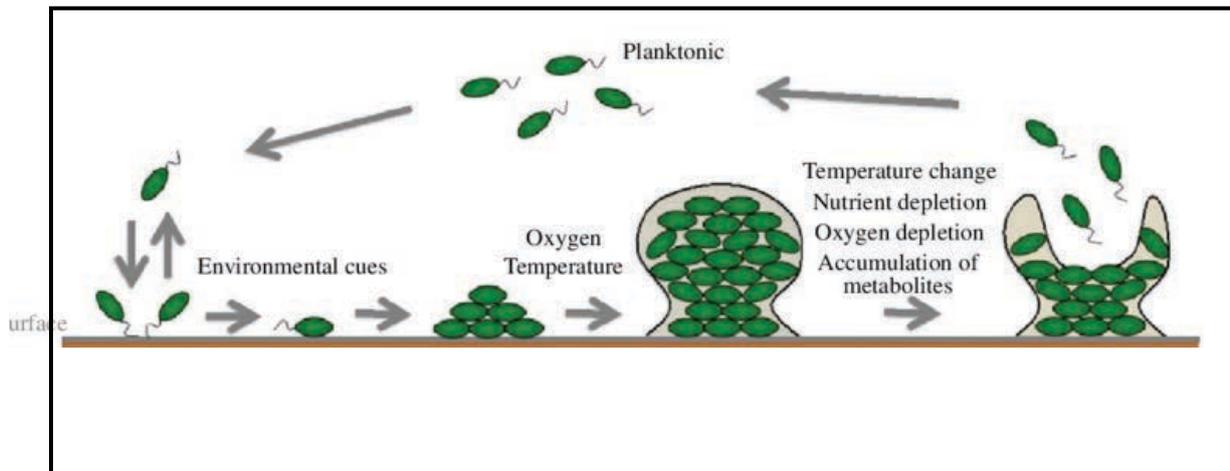


Figure 5 : Formation du biofilm et ses différentes étapes (46)

1.4.1.4. Traitements

Les DFIs sont une complication sévère du diabète qui restent aujourd'hui difficiles à traiter. Leur prise en charge par une équipe pluridisciplinaire et dans un centre de référence permet de favoriser leur guérison et le sauvetage du membre. Une antibiothérapie empirique couvrant les pathogènes les plus communs doit rapidement être instaurée. Avec les antibiogrammes effectués sur les biopsies, elle sera réévaluée et réadaptée pour ne cibler que les microorganismes présents (23)(47). La durée du traitement n'est pas clairement déterminée et varie en fonction de la sévérité de l'infection. Pour les infections sévères à modérées, cette durée serait de 1 à 2 semaines, et pour les plus sévères de 2 à 4 semaines voire 6 semaines dans des cas d'ostéomyélites graves. L'antibiothérapie est arrêtée à la disparition des signes de l'infection, même si la plaie n'est pas complètement cicatrisée (47). Il n'existe pas de molécules préférentielles dans les antibiotiques (ATBs) référencés pour les DFIs ; une bonne diffusion dans l'os et bonne biodisponibilité orale sont indispensables. La voie parentérale n'est réservée qu'aux patients avec des infections sévères, à pathogènes non sensibles aux ATBs oraux ou lorsqu'il existe des vomissements. La voie orale est recommandée pour diminuer le temps d'hospitalisation et le coût du traitement (34). L'instauration d'une antibiothérapie sur une plaie non infectée n'a pas montré d'intérêt dans l'accélération de la cicatrisation. Elle augmente le coût des soins, le risque de développer des effets secondaires indésirables et des résistances bactériennes. Elle ne doit être réservée qu'aux infections

avérées (23)(27). La plupart des lésions du pied diabétique nécessitent des actes chirurgicaux. Ces interventions peuvent être des drainages ou des débridements mineurs, des résections étendues, de la revascularisation, et dans le pire des cas des amputations (23)(27). L'éradication des biofilms passe par une élimination physique (Figure 6). Il a été montré que le débridement altère la structure protectrice de l'enveloppe exposant les microorganismes à l'action des antibactériens (23)(48).



Figure 6 : Curettage du biofilm d'une plaie infectée d'un diabétique (49)

Dans les DFOs, le bénéfice des amputations systématiques pour le retrait de l'os infecté est désormais contesté. Des études récentes ont en effet prouvé l'efficacité des chirurgies conservatrices (34). Il n'existe pas de référentiel qui permette à l'équipe de soignants de choisir entre une approche plutôt médicale ou chirurgicale pour le sauvetage du membre. Pour une bonne guérison, il est aussi important de rétablir l'équilibre glycémique, d'adapter les soins et types de pansements à la plaie, et d'instaurer une décharge mécanique (suppression des appuis) du pied (27)(47). L'éducation du patient est également primordiale. Une bonne observance diminue considérablement le risque d'ulcères et donc d'infections (27).

1.5. Conclusion

Le diabète est une maladie en constante augmentation. Toutes les parties du corps sont concernées, à commencer par les pieds fréquemment touchés les premiers. À mesure que la pandémie du diabète progresse à l'échelle mondiale, il en va de même des complications podologiques. 50 % des ulcères s'infecteront, et 20 % aboutiront à une amputation du membre inférieur. Les DFIs sont très graves, invalidantes et leur traitement est encore complexe et très coûteux. Leur prise en charge repose sur une antibiothérapie et des soins de plaie. Malgré des progrès médicaux et chirurgicaux significatifs, ces infections restent un problème de santé publique. La communauté scientifique s'efforce de trouver de nouveaux systèmes de délivrance des ATBs, notamment pour s'affranchir des problèmes vasculaires et de leur mauvaise pénétrance au site infecté. L'administration locale permettrait d'augmenter la quantité de principe actif directement dans la plaie sans effet toxique pour l'organisme.

2. Les systèmes à libération locale

La voie d'administration des médicaments est essentielle pour leur efficacité et le traitement des maladies. Il existe de nombreuses voies pour administrer les principes actifs (orale, parentérale, sous-muqueuse...). Dans certaines affections telles que les DFIs, les problèmes de vascularisation entraînent un faible niveau d'absorption des molécules, une action lente, une délivrance non spécifique et de potentiels effets secondaires non ciblés. L'administration locale est une technologie qui limite la distribution et l'absorption d'un médicament sur un site défini. Le but de cette approche est d'améliorer la biodisponibilité des molécules au site de la maladie, de réduire la fréquence d'administration et de minimiser les effets secondaires systémiques.

2.1. Les pansements

Actuellement, il existe sur le marché une large gamme de pansements de diverses formulations. Ces pansements sont classés en fonction de leurs caractéristiques et du type de plaie (Tableau 2). Ce classement constitue un outil pour orienter le choix des professionnels de santé (50). Il n'existe pas de pansement « idéal » mais la communauté scientifique s'efforce de développer de nouveaux dispositifs répondant au cahier des charges présenté Figure 7. Traditionnellement utilisés pour protéger les plaies des agressions extérieures, et destinés aux traitements et aux soins des plaies pour favoriser la cicatrisation, ils sont exploités depuis plusieurs années comme plateforme pour la délivrance locale de molécules actives. On parle de pansements techniques dits « avancés ». Ils sont constitués de divers biomatériaux, et les substances dont ils sont imprégnés agissent directement ou indirectement sur le processus de cicatrisation (51). L'accélération et l'amélioration de la régénération de la peau permet de lui rendre son intégrité, ses fonctions protectrice et homéostatique, de réduire les temps des soins, les rechutes et le coût de prise en charge.

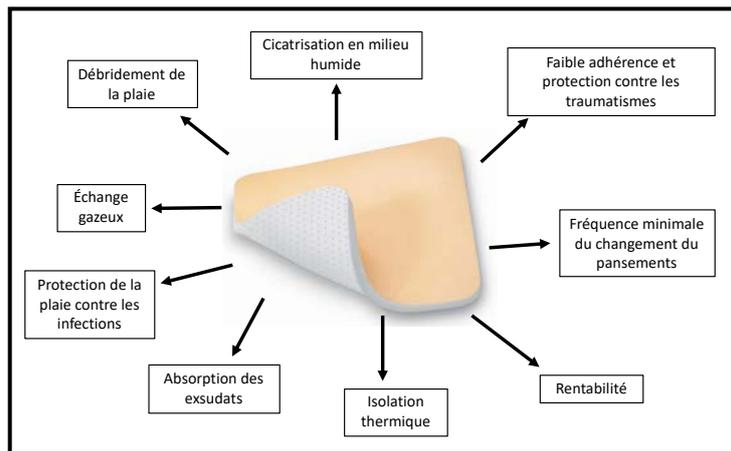


Figure 7 : Caractéristiques d'un pansement « idéal » (52)

Tableau 2 : Les différents types de pansements et leurs applications. Modifié de l'HAS (Haute Autorité de Santé) 2007

Pansement	Composition	Effet	Application
Hydrogels	Réseau polymère hydrophile gonflé d'eau	Hydratation et déterision autolytique	Plaie non-infectée et peu exsudative
Irrigo-absorbants	Polyacrylate	Absorption et irrigation de la plaie.	Plaies en phase détersive
Alginates	Polymère naturel d'acide alginique associé ou non à la CMC (carboxyméthylcellulose) et l'acide hyaluronique	Absorption, formation d'un gel non-adhérent, hémostatique antibactérien	Plaies hémorragiques, plaies présentant une colonisation critique. Phase de déterision et phase de bourgeonnement
Hydrofibres	100% fibres non tissées de CMC sodique	Grande capacité d'absorption, gélification au contact	Plaies très exsudatives de la phase de déterision à la phase de bourgeonnement.
Hydrocellulaires	Mousse de polyuréthane	Absorbant	Phase de déterision et phase de bourgeonnement
Hydrocolloïdes	100% fibres de CMC sodique	Imperméabilité à l'eau et aux bactéries, absorbant	Plaies peu exsudatives non-infectées en phase d'épidermisation
Tulles	Compresse de mailles larges enduites de vaseline ou paraffine	Pas d'adhérence	Dermabrasions et brûlure de la phase de bourgeonnement à la phase d'épidermisation
Interfaces	Mailles étroites enduites de silicone, CMC et technologie lipido-colloïdes	Évite le dessèchement	Dermabrasions et brûlures de la phase de bourgeonnement à la phase d'épidermisation
Films	Film polymère	Adhérent et semi-perméable	Escarres ou pansement secondaire
Acide Hyaluronique	Compresse	Déclenche la cicatrisation des plaies présentant des tissus de granulation inflammatoires	Plaies chroniques

2.1.1. Les pansements pro-cicatrisants

Ils favorisent directement la réparation de la peau grâce à des molécules qui agissent à différents stades essentiels de la cicatrisation. Ces pansements ne sont en revanche utilisés que sur terrains non infectés. Ils ne conviennent donc pas pour le traitement de l'infection du pied diabétique.

2.1.1.1. L'acide hyaluronique (AH)

L'acide hyaluronique est un polysaccharide endogène composé d'acide D-glucuronique et de D-N-acétylglucosamine, liés entre eux par des liaisons glycosidiques. C'est un des composants de la matrice extracellulaire des tissus humains. Il est particulièrement présent dans les tissus conjonctifs de la peau. Il joue également un rôle clé dans la réparation des tissus à différentes phases de la cicatrisation, en permettant la prolifération, la migration et l'hydratation des cellules (53). La méta-analyse menée par Chen et al., a montré l'efficacité de l'AH indépendamment de sa forme galénique, pour le traitement des ulcères diabétiques, en accélérant la guérison à 12 semaines (54). L'essai contrôlé, conduit en double aveugle et randomisé de Humbert et al. conclu à une différence significative de la réduction de la taille des ulcères au 45^{ème} jour, lorsque les patients sont traités par des gazes *IALUSET*[®] imprégnées à l'AH plutôt qu'avec des gazes classiques sans AH. Le nombre de guérisons complètes à 45 jours également été plus important (55). L'HAS a aussi estimé, pour ce pansement, le service attendu suffisant pour le traitement des ulcères de jambe mais dans un contexte non infecté

2.1.1.2. Le sucrose octasulfate (NOSF : Nano Oligosaccharide Factor)

Le laboratoire Urgo a mis au point récemment un nouveau pansement, *UrgoStart*[®], contenant du sucrose octasulfate ou facteur nano-oligosaccharide. Il inhibe l'excès de métalloprotéases et interagit avec les facteurs de croissance pour la régénération tissulaire. Chez les diabétiques, l'augmentation de la concentration des protéases est un des facteurs dérégulant le processus de cicatrisation et favorisant l'apparition des ulcères (56). Dans une étude internationale, multicentrique, en double aveugle et randomisée, Edmonds et al.

comparent le pansement *UrgoStart*[®] à un pansement contrôle de même composition (matrice lipido-colloïdale) mais sans le principe actif sucrose octasulfate. Ils ont montré l'amélioration de la fermeture des ulcères d'origine neuro-ischémique, chez les patients diabétiques, après 20 semaines pour le groupe soigné avec le pansement pro-cicatrisant actif (56). Il existe cependant un risque infectieux avec ce traitement. L'HAS a donc estimé un service attendu suffisant pour les pansements *UrgoStart*[®] dans le traitement des ulcères de jambe et des ulcères du pied diabétique d'origine neuro-ischémique non infectés, en phase de bourgeonnement.

2.1.1.3. La recherche pour d'autres pansements pro-cicatrisant

Depuis plusieurs années les chercheurs s'intéressent à la fonctionnalisation de supports par des agents biologiques tels que des facteurs de croissance, des acides nucléiques et des cellules souches. L'implication des facteurs de croissance dans le déroulement de la cicatrisation des plaies a été démontrée et résumée par Barrientos et *al.* dans une large revue (57). À ce jour, il n'existe qu'une spécialité sous forme la forme d'une crème (REGRANEX[®]), à la beralpermine (facteur de croissance recombinant), approuvée et commercialisée en France. Des pansements biocompatibles à base de gélatine, dextran, collagène et chitosan sont en cours de développement par plusieurs équipes. Mais la délivrance locale des facteurs de croissance présente certaines difficultés qui limitent le succès des essais cliniques. La communauté scientifique oriente donc ses recherches vers l'incorporation d'acides nucléiques qui stimuleraient les cellules pour la production de facteurs de croissance endogènes directement dans la plaie. La mise en évidence du rôle des cellules souches dans la régulation du processus de régénération a aussi suscité la curiosité des sociétés savantes (51).

Dans le cadre des plaies infectées comme celles du pied diabétique, ces technologies innovantes n'ont pas montré d'intérêt (34)(47). L'éradication de l'invasion par des micro-organismes pathogènes doit être la priorité pour permettre une bonne cicatrisation et éviter les rechutes. De plus un dispositif non antibactérien implanté sur une plaie chronique

colonisée est un facteur de risque d'aggravation car il constitue un support inerte favorable à l'adhésion des bactéries et au développement d'un biofilm.

2.1.2. Pansements antibactériens

2.1.2.1. Imprégnés d'antibiotiques

La libération locale d'ATBs suscite de plus en plus d'intérêt. Les infections du pied diabétique sont des zones hyperkératosiques, mal vascularisées voir nécrosées qui entraînent une très faible disponibilité des antibiotiques. Par voie systémique, il faut des concentrations élevées pour atteindre la CMI, avec un risque de toxicité pour les organes majorée. Une libération locale permet d'atteindre de plus grandes concentrations au site infecté sans effets secondaires pour l'organisme. La matrice des pansements est constituée de produits naturels ou synthétiques, et se présente sous la forme d'éponge, d'hydrogel, d'hydrocolloïde, de film ou de membrane. Chaque forme présente des avantages et des inconvénients en fonction du type de plaie (58). La revue de Simões et *al.* regroupe différentes études récentes de ces nouveaux dispositifs techniques. Les ATBs utilisés pour fonctionnaliser les pansements appartiennent aux familles des aminoglycosides, β -lactamines, glycopeptides, quinolones, sulphonamides et tétracyclines. Les résultats ont montré une inhibition de la croissance des bactéries Gram+ et Gram- (58). Cependant, la récurrence de l'utilisation de ces principes actifs conduit fréquemment à l'émergence de résistances bactériennes et à l'appauvrissement des stratégies thérapeutiques.

En l'absence de nouvelles molécules, les chercheurs se tournent vers d'autres composés non antibiotiques ayant des propriétés antibactériennes qui limitent le développement des résistances bactériennes.

2.1.2.2. La chlorhexidine

La chlorhexidine est le gold standard des antiseptiques grâce à son large spectre sur les Gram+ et Gram-, les levures et les virus (59). Elle constitue le candidat idéal pour le

développement d'un pansement combiné. Le *BACTIGRAS*[®] et le *3MTM TEGADERMTM CHG* (gluconate de chlorhexidine) sont déjà commercialisés mais ne sont pas indiqués pour le traitement d'une plaie infectée du pied diabétique. Rossi et *al.* ont mis au point un pansement à base de chitosan et d'AH chargé en chlorhexidine ayant des propriétés antibactérienne et prometteur pour le traitement des ulcères (60). Agarwal et *al.* ont démontré l'efficacité d'un textile fonctionnalisé par multicouches polyélectrolyte et imprégné de chlorhexidine pour réduire une charge bactérienne et prévenir l'infection d'une plaie (59). Plus récemment notre équipe et l'UMET-ISP ont travaillé à l'élaboration d'un dispositif antibactérien applicable à des ulcères infectés. Nous avons incorporé la chlorhexidine dans une matrice sous la forme d'une éponge de chitosan et de polymère de cyclodextrines pour une libération et une activité antibactérienne prolongées (61).

2.1.2.3. L'ion argentique

L'argent est utilisé comme antibactérien depuis l'antiquité. En Grèce, il servait à la décontamination et à la conservation de l'eau. Au fur et à mesure des siècles, les médecins l'ont intégré à leurs pratiques chirurgicales et médicales (62). Aujourd'hui l'argent fonctionnalise de nombreux dispositifs médicaux dont les prothèses vasculaires et orthopédiques, les pansements, les cathéters veineux, les sondes urinaires et les lentilles de contact (63). Pour avoir une activité antibactérienne, l'argent doit être sous sa forme d'ion. En attaquant les cellules bactériennes sur de nombreux sites, ces ions entraînent leur destruction et minimisent le développement de mécanismes de résistance. Des études ont aussi montré les effets de l'argent dans la cicatrisation grâce à ses propriétés anti-inflammatoires et sa capacité à favoriser la néovascularisation (64). Il existe de très nombreux pansements à l'argent. Dans leur revue Boateng et *al.* résument les principaux pansements commercialisés, en fonction de leurs formes (51). Plus récemment les chercheurs se sont concentrés sur la production de nanoparticules à l'argent. Cette nanotechnologie permet d'améliorer les propriétés antibactériennes de l'argent et permet donc de diminuer sa CMI. Il existe déjà des pansements contenant des nanoparticules à l'argent sur le marché (58).

2.1.2.4. Avec des substances naturelles

Le développement de pansements à base de produits naturels suscite un intérêt croissant depuis quelques années.

Le miel est connu pour être appliqué sur des plaies depuis l'ancien temps. Il possède de nombreux effets pharmacologiques qui permettent d'améliorer la cicatrisation, comme une activité antibactérienne. Ses propriétés antimicrobiennes sont liées à son taux élevé en sucre, sa faible teneur en eau, son acidité, la présence de peroxyde d'hydrogène, de peptides antimicrobiens, de flavonoïdes et d'acides phénoliques. Il est actif sur un grand nombre de Gram+ et Gram-, certains champignons, et il prévient l'apparition des biofilms (51)(58). Les pansements à base de miel sont disponibles dans différentes préparations telles que les tulles, les alginates et les hydrogels (51). Malgré le nombre croissant de rapports scientifiques montrant les bienfaits du miel dans certaines situations désespérées de plaies chroniques, il n'existe pas d'études permettant de tirer des conclusions quant à ses effets en tant que traitement topique. De plus son utilisation chez des patients diabétiques augmente le risque d'hyperglycémie, nécessitant une surveillance accrue (51).

Des huiles essentielles sont désormais incorporées comme agents antibactériens dans des pansements actifs. Grâce à leurs composés phénoliques, elles rendent la paroi des bactéries plus perméable, conduisant à une lyse cellulaire. Le cinnamaldéhyde, le géraniol, les analogues du thymol, le menthol et le carvacrol sont les principaux composants des huiles utilisées pour fonctionnaliser des dispositifs médicaux topiques (58).

D'autres composés naturels ont aussi attiré l'attention des chercheurs comme la curcumine ou l'*Aloe vera* qui font l'objet d'études pour la fonctionnalisation de composites ou de membranes (58).

Ces dispositifs médicaux déjà existant ou en cours de développement n'ont pas prouvé leur efficacité pour une application dans le traitement de plaies infectées du pied chez le patient diabétique. Les supports et les principes actifs actuels ne sont pas adaptés pour la prise en charge de telles infections. Elles sont souvent profondes, avec une atteinte osseuse, et polymicrobiennes, nécessitant des soins particuliers et l'utilisation d'antimicrobiens en bithérapie pour une action complète sur les pathogènes et pour éviter les sélections de résistance.

2.2. Les systèmes à libération locale pour les infections profondes du pied diabétique

Une étude a montré la faible pénétrance des ATBs au site infecté dans les infections du pied diabétique lorsqu'ils sont distribués par voie systémique (65). L'administration locale est une solution pour palier à l'hypo-perfusion du pied et les comorbidités liées à l'insuffisance vasculaire. Elle permet aussi de raccourcir le temps du traitement oral ou intra-veineux, et de diminuer le coût de la prise en charge.

Il existe plusieurs stratégies pour la délivrance locale d'ATBs pour le traitement des infections du pied diabétique. Beaucoup sont utilisées pour combler les plaies quand les défauts osseux sont importants et pour éviter la ré-accumulation de pus.

2.2.1. Le polyméthacrylate de méthyle (PMMA)

Les matériaux à base de PMMA sont utilisés depuis longtemps dans les infections ostéo-articulaires (66). Ces dispositifs médicaux augmentent la concentration locale en ATBs aux sites infectés, mais ne dispensent pas d'une antibiothérapie systémique conventionnelle (67). La diffusion du principe actif est maximale pendant les premières 48 heures et peut durer jusqu'à plusieurs mois (67). Des études ont montré que la libération est en revanche incomplète (68). Ces matériaux existent sous plusieurs formes galéniques : les ciments (Figure 8 A), essentiellement implantés pour combler les vides laissés par des résections importantes, et les billes (67)(69)(70) (Figure 8 B). Ils permettent d'éviter des amputations majeures. L'inconvénient de ces systèmes à libération est qu'ils ne sont pas biodégradables. Ils doivent être retirés chirurgicalement ce qui comporte un nouveau risque infectieux (70). Le PMMA, est considéré comme le plus favorable des biomatériaux à l'adhésion de bactéries et la formation de biofilm. Néanmoins, des cas décrivant la colonisation de surfaces en PMMA imprégnées avec des antimicrobiens ont récemment été décrits (71).

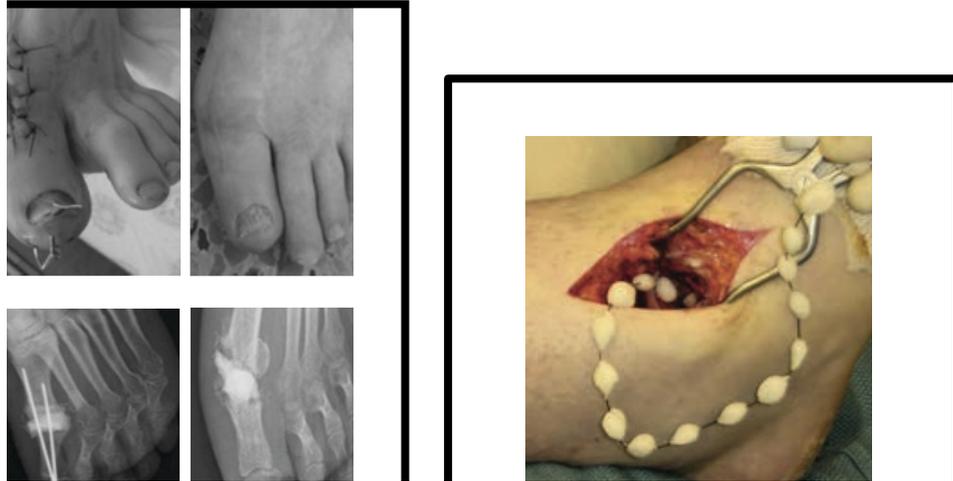


Figure 8 : (A) Implantation d'un ciment à base de PMMA contenant de la gentamicine après un débridement étendu dans un cas d'ostéomyélite du pied diabétique (72); (B) Billes de PMMA imprégnées d'antibiotiques pour le traitement d'une infection du pied chez un patient diabétique (73).

2.2.2. Le sulfate de calcium purifié (CaSO_4)

Le sulfate de calcium fait partie de l'arsenal thérapeutique des affections orthopédiques depuis la fin du 19^{ème} siècle (74). Il a l'avantage d'être biodégradable, ostéoconducteur, et d'avoir une cinétique de libération des ATBs prévisible (75)(76). En 2011 Gauland et *al.* ont montré sur une large étude de patients atteints d'ostéomyélite, les effets bénéfiques de billes de CaSO_4 (Figure 9). Dans 70 % la guérison était constatée sans thérapie systémique orale ou intraveineuse adjuvante (75). Plus récemment Drampalos et *al.* ont décrit une technique chirurgicale pour l'implantation d'un biocomposite de CaSO_4 et d'hydroxyapatite pour le traitement des infection du calcaneum. L'approche nécessite de percer l'os pour créer un tunnel dans lequel est déposé le biocomposite (77). Les complications peuvent être liées à une réponse cytotoxique inflammatoire retardant la cicatrisation, comme à celles de l'acte chirurgical (68).



Figure 9 :

évitalisés (75)

2.2.3. Les éponges de collagène

Le développement d'éponges à base de collagène est au cœur de la recherche depuis plusieurs années. Les avantages d'une éponge sont sa taille et sa forme facilement modulables à tout type de plaie, et sa capacité à remplir les espaces morts par expansion. Le collagène est d'origine bovine ou équine, et similaire au collagène humain (78)(79). Il est dégradé par la collagénase humaine, ce qui le rend biorésorbable (79). L'efficacité de ce dispositif médical est controversée. Dans l'étude menée par Varga et *al.*, l'utilisation d'éponges à la gentamicine Collatamp® EG a permis de diminuer de deux semaines le temps de cicatrisation d'ulcères infectés chez des patients diabétiques. Ces résultats sont intéressants en terme d'impact économique et de réduction de temps de cicatrisation permettant d'améliorer la qualité de vie des patients (79). En 2018, les essais randomisés et contrôlés d'Uçkay et *al.* avec les mêmes éponges à la gentamicine, mais sous un autre nom commercial, Garamycin®, ne retrouvaient pas les mêmes résultats (80)(81). Les groupes recevant le dispositif Garamycin® ne montraient pas de signes d'amélioration clinique par rapport aux groupes ne recevant qu'une antibiothérapie systémique ou des soins locaux classiques. Ces études ont cependant été conduites sur de petites cohortes. Des essais de plus grande envergure doivent être réalisés avant de décider d'éliminer ce dispositif de l'arsenal thérapeutique.

2.3. Conclusion

Il a été établi depuis des années que l'utilisation en systémique des ATBs limite leur performance. Leur distribution n'est pas seulement localisée aux sites ciblés, mais à l'ensemble des organes du corps humain entraînant une faible délivrance aux zones infectées.

L'absorption tissulaire empêche d'augmenter les doses administrées au risque d'induire des effets indésirables, telle qu'une néphrotoxicité et une hépatotoxicité. En conséquence, les microorganismes responsables de l'infection ne peuvent être éradiqués. Ils risquent de développer des mécanismes de résistances aux ATBs actuellement disponibles. La solution consiste à développer des dispositifs permettant de libérer localement les ATBs dans la plaie. La concentration locale peut être augmentée en évitant les toxicités. Ce type de traitement semble être une solution prometteuse pour le traitement des DFIs de façon à réduire le coût de leur prise en charge parfois lourde et longue. En limitant l'utilisation de produits par voie générale, on évite l'émergence de sélection de résistances en maintenant l'arsenal thérapeutique actuel efficace.

Il existe à ce jour peu d'investigations et de données en matière de dispositifs médicaux pour la libération d'antimicrobiens dans le domaine des infections du pied chez le patient diabétique. Les études menées manquent de robustesse et il n'a pas été déterminé si les applications d'ATBs doivent être supplémentées par une thérapie systémique et/ou des interventions chirurgicales. Des essais cliniques robustes doivent être conduits pour établir l'efficacité de ces nouvelles technologies et définir le cadre de leur usage. Les chercheurs doivent aussi développer de nouveaux supports pour la libération locale plus adaptés aux besoins. Les hydrogels semblent être intéressants pour répondre à cette problématique. Ils peuvent être utilisés sous plusieurs formes. Plus particulièrement, les éponges *i.e* hydrogels lyophilisés s'adaptent parfaitement au comblement d'un défaut osseux.

3. Les hydrogels et éponges

3.1. Les hydrogels

Les hydrogels ont une structure tridimensionnelle constituée de chaînes polymères (82). Ils possèdent de nombreux groupes hydrophiles tels que les groupements amine ($-NH_2$), hydroxyle ($-OH$), carboxyle ($-COOH$), amide ($-CONH$) ou sulfonique ($-SO_3H$), leur conférant une grande affinité pour l'eau (83). Le réseau d'un hydrogel est formé de liaisons chimiques ou physiques qui empêchent sa dissolution (84). Au contact de l'eau, ce réseau gonfle en formant des matériaux viscoélastiques (85). Le gonflement est le résultat d'un équilibre entre les forces de cohésion élastique développées entre les chaînes polymères et la force osmotique appliquée par les molécules du fluide sur le réseau (86)(83). La très forte teneur en eau ($\geq 90\%$) des hydrogels et leurs propriétés viscoélastiques ajustables permettent de ne pas induire d'irritation sur les tissus et les rendent compatibles avec leur environnement (84)(87).

La littérature propose plusieurs classifications des hydrogels, basées sur leurs propriétés, présentées Figure 10.

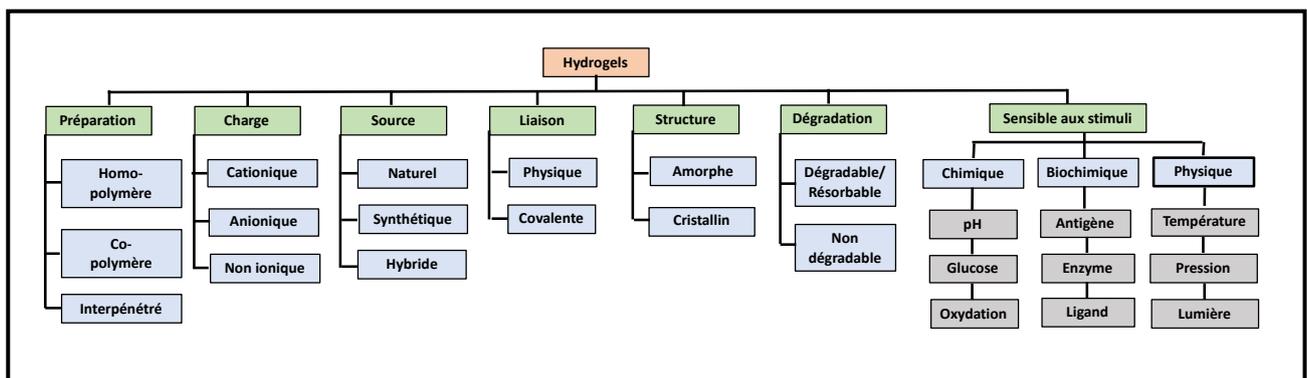


Figure 10 : Classification des hydrogels adaptée de (83)(88)

En raison de leur caractère hydrophile et de leur biocompatibilité, les hydrogels présentent un grand intérêt pour la recherche sur les biomatériaux depuis de nombreuses années (89). Ils sont largement utilisés dans le domaine médical, notamment comme

transporteurs pour le développement de nouvelles formulations pharmaceutiques, la délivrance de biomolécules, ou l'ingénierie tissulaire (86)(90)(87).

3.1.1. Caractérisation rhéologique des hydrogels

La rhéologie est l'étude de l'écoulement et de la déformation de la matière sous la force d'une contrainte (91). Les fluides sont composés de molécules de tailles différentes, ce qui influence leur glissement les unes sur les autres (dispersion). La viscosité dépend de ce glissement (92). Le comportement d'un matériau est basé sur ses composantes élastique et visqueuse. La rhéologie permet de suivre la transition sol-gel (gélification) mais aussi de caractériser les propriétés viscoélastiques d'un hydrogel préformé. Un modèle de deux plaques entre lesquelles est appliquée une contrainte de cisaillement permet de définir les paramètres rhéologiques (Figure 11). Le cisaillement est défini par la déformation (γ), le taux de cisaillement ($\dot{\gamma}$) et la contrainte de cisaillement (τ) (92).

Pour caractériser les matériaux viscoélastiques trois paramètres sont essentiels : le module de conservation (G') et le module de perte (G'') qui dérivent du module de cisaillement (G), et la viscosité (η) (93) :

$$G = \frac{\tau A}{\gamma A} \quad (\tau A : \text{l'amplitude de cisaillement} ; \gamma A : \text{l'amplitude de déformation})$$

- G' est l'énergie de déformation stockée pendant le cisaillement. Il représente le comportement élastique du matériau (91). Il est exprimé par $G' = G \cos \delta$ (94).
- G'' est l'énergie consommée et perdue par la déformation qui est alors irréversible. Il représente la composante visqueuse du matériau (91). Il est exprimé par $G'' = G \sin \delta$ (94).

Le point gel marque le passage de l'état viscoélastique à l'état de gel élastique. Il est un brusque changement des propriétés viscoélastiques qui correspond à la formation du réseau 3D qui se tisse au sein du matériau. Il est défini lorsque $G' = G''$. Avant le point gel, la contrainte

imposée est dissipée par le glissement des molécules les unes sur les autres (comportement viscoélastique $G'' > G'$). Après le point gel, les molécules sont physiquement liées. Leur énergie n'est plus dissipée mais conservée (comportement élastique $G' > G''$). Le ratio entre la composante élastique et la composante viscoélastique est la tangente δ ($\tan \delta = G''/G'$) (95). Elle représente la balance viscoélastique et la force du gel. Plus elle est faible, plus les interactions entre les composants du gel sont fortes. La méthode la plus efficace pour mesurer les propriétés viscoélastiques des hydrogels consiste à appliquer une contrainte d'oscillation (92).

- La viscosité d'un mélange est étudiée par une contrainte en mode rotation (92). η est une mesure de la capacité de l'hydrogel à résister à la déformation en réponse à une contrainte (96) :

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}_0} \quad (\tau : \text{la contrainte de cisaillement} ; \dot{\gamma}_0 : \text{le taux de cisaillement}) \quad (92)$$

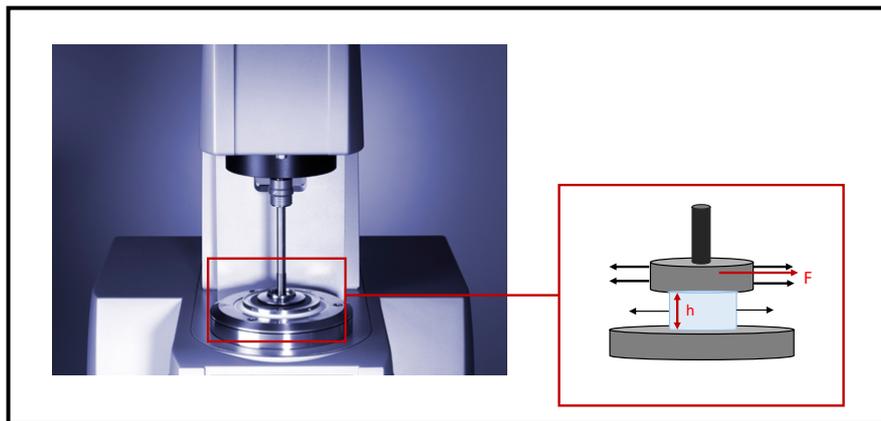


Figure 11 : Modèle de deux plateaux pour le test de cisaillement avec un plateau supérieur mobile (rotor) et un plateau inférieur fixe (stator) (97)

3.1.2. Les hydrogels à base de polymères naturels

Les hydrogels composés de polymères naturels présentent des caractéristiques particulièrement intéressantes liées à leurs propriétés de biocompatibilité, de biodégradabilité, et leur faible toxicité (98)(99). Leur dégradation enzymatique non toxique est particulièrement utile à la libération contrôlée de principes actifs (98). Les propriétés biologiques de ces composés, et la « chimie verte » utilisée pour leur fabrication s'inscrit dans

le contexte écologique actuel. Ils constituent donc un excellent choix de matériaux pour la conception de dispositifs médicaux. Le Tableau 3 résume les principaux polymères naturels utilisés pour la formation d'hydrogels, et certaines de leurs applications dans le domaine biomédical (89).

Tableau 3 : Polymères naturels servant de base à l'obtention d'un hydrogel et exemples d'application en médecine

Polymères naturels	Applications	Référence
Acide hyaluronique	Ingénierie tissulaire (régénération cartilagineuse)	(100)
	Délivrance oculaire de principes actifs	(101)
	Délivrance de constituants de la matrice extracellulaire pour la stimulation de la chondrogénèse	(102)
Gélatine	Ingénierie tissulaire (régénération rétinienne)	(103)
	Stimulation de la formation d'un réseau microvasculaire	(104)
Collagène	Ingénierie tissulaire (cartilagineuse)	(105)
	Libération de riboflavine pour la reconstruction méniscale	(106)
Chitosan	Encapsulation de cellules souches pour la reconstruction de la moelle épinière	(107)
	Hydrogel ayant des propriétés antibactériennes	(108)
	Ingénierie tissulaire (libération de VEGF pour la reconstruction osseuse maxillo-faciale)	(109)
	Libération de ciprofloxacine pour application antibactérienne	(110)
Alginate	Stimulation de la neurogénèse par encapsulation de cellules neuronales	(111)
	Hydrogel ayant des propriétés accélérant la cicatrisation	(112), (113),
Cellulose	Hydrogel ayant des propriétés accélérant la cicatrisation	(112)
	Libération d'antibiotiques pour l'accélération de la cicatrisation	(114)
Fibrine	Encapsulation de cellules souches pour la reconstruction de la moelle épinière	(115)
	Ingénierie tissulaire (reconstruction cartilagineuse nasale)	(116)
Pectine	Libération de lidocaïne pour le traitement de la douleur des plaies	(117)
	Hydrogel pour une application subcutanée	(118)
	Délivrance de sulfasalazine pour le traitement de la colite ulcéreuse	(119)
Agar	Hydrogel pour une application cutanée dans les plaies	(120)
	Hydrogel ayant des propriétés cicatrisantes	(121)
Polylysine	Ingénierie tissulaire (reconstruction nerveuse périphérique)	(122)
	Hydrogel ayant des propriétés antibactériennes pour le traitement des infections	(123)
Dextrane	Délivrance de protéines comme support pour l'ingénierie tissulaire	(124)
	Hydrogel ayant des propriétés accélérant la cicatrisation	(125), (126)

Le chitosan est un matériau prometteur en raison de son faible coût de production et de sa biocompatibilité. Il est doté de propriétés physico-chimiques et biologiques particulièrement attrayantes et connaît un engouement très important dans divers domaines et notamment le biomédical. Il peut être utilisé sous différentes formes et pour de nombreuses applications.

3.1.2.1. *Le chitosan (CHT)*

Le CHT est principalement issu de la chitine qui est le polymère naturel le plus abondant après la cellulose (127)(128). Il est obtenu par des procédés de N-désacétylation enzymatique ou chimique (Figure 12). La voie chimique est la plus utilisée en raison de son faible coût et de son aptitude à la production de masse (129). La chitine est très abondante dans la paroi de l'exosquelette des crustacés et des insectes, et le CHT est trouvé naturellement dans la paroi cellulaire de certains champignons (127)(128). La chitine et le chitosan ont des propriétés biodégradables, biocompatibles et « eco-friendly » qui les rendent très intéressants dans divers domaines tels que l'agriculture, l'industrie alimentaire et cosmétique ou le traitement des eaux (129). Malgré ses caractéristiques biologiques et sa haute résistance mécanique, l'utilisation de la chitine est limitée compte tenu de sa faible solubilité (128). Le CHT a lui, une activité antibactérienne, antifongique, antivirale, une faible immunogénicité et toxicité qui améliorent ses perspectives pour des applications biomédicales (130)(131).

Le CHT est un polysaccharide linéaire semi-cristallin, constitué de deux unités répétitives N-acétyl-2-amino-2-deoxy-D-glycopyranose et 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose liées par des liaisons glycosidiques $\beta(1\rightarrow4)$ (Figure 12) (128). Le ratio entre ces unités définit le degré de désacétylation (DDA). Il est supérieur à 50 % pour le CHT et inférieur à 50 % pour la chitine (127)(129). Ses propriétés fonctionnelles sont dépendantes du DDA et de sa masse molaire (MM), qui varie en fonction de la source et de la procédure de fabrication. Ces deux paramètres affecteront les applications potentielles du CHT en fonction du domaine et de la forme sous laquelle il sera modifié (127).

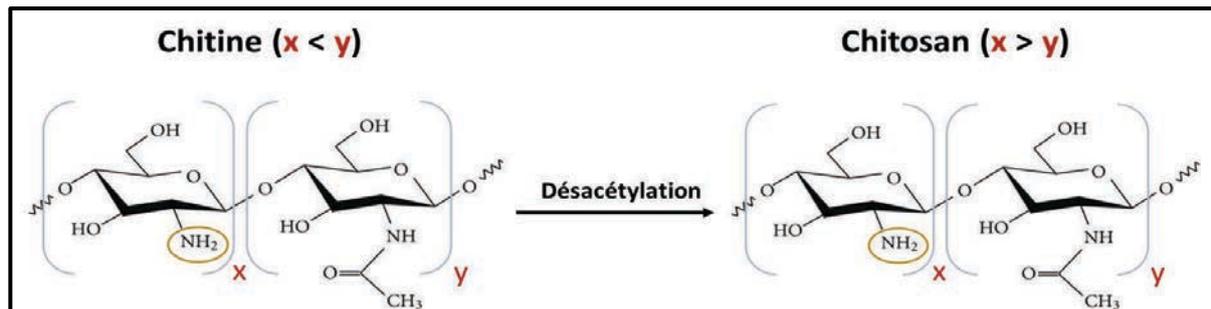


Figure 12 : Formation du CHT après désacétylation de la chitine par voie enzymatique ou chimique (132)

Des modifications par voie chimique, physique ou enzymatique du CHT peuvent être réalisées pour améliorer ses propriétés physicochimiques. La voie chimique est la plus employée et permet de synthétiser des dérivés dont on contrôle la solubilité, les caractéristiques ioniques et hydrophiles. Ces améliorations se font principalement par la transformation des groupements hydroxyles, amines et acétamides, des greffes, des réarrangements, des scissions et des mélanges à d'autres composés (127)(128).

3.1.2.2. Propriétés intrinsèques du CHT

Le CHT est largement utilisé depuis des décennies. Ses propriétés intrinsèques le rendent particulièrement intéressant en médecine et comme support pour la délivrance de médicaments.

Depuis des années les chercheurs ont mis en évidence la non-toxicité du CHT (133). La biocompatibilité a longtemps été assimilée à une absence de toxicité (134). Dans une revue détaillée, les auteurs distinguent les deux concepts comme étant différents (135). La toxicité est définie par les dommages causés par une molécule ou un matériau sur l'organisme, tandis que la biocompatibilité est l'effet néfaste ou bénéfique du matériau sur l'environnement, mais également de l'environnement physiologique sur les performances du matériau (Figure 13) (134). Le CHT est considéré comme biocompatible, minimisant ainsi les réponses de l'organisme (127)(136)(137). Sa structure est particulièrement proche de celle des glycosaminoglycanes (GAG) de la matrice extracellulaire, les glycopeptides et glycolipides

(138)(139). L'étude de ses mécanismes de distribution intracellulaire pourrait aussi nous éclairer sur le pourquoi de sa compatibilité (140).

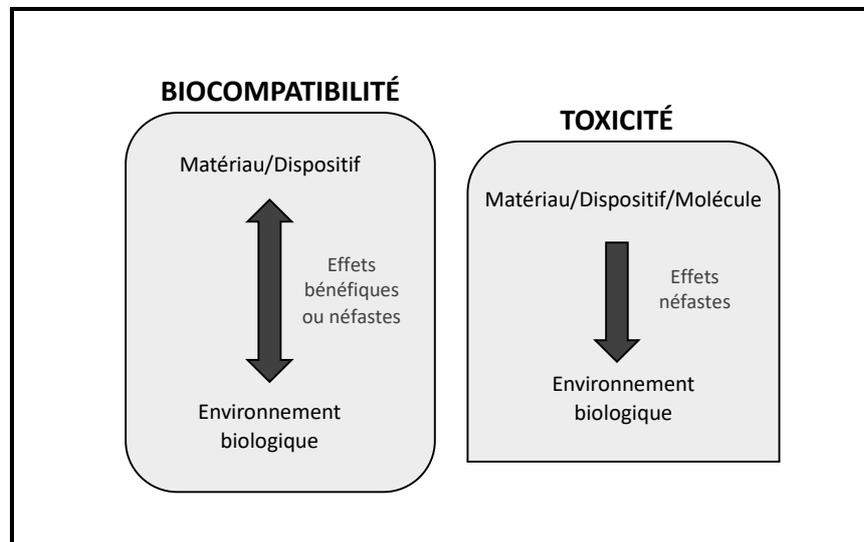


Figure 13 : Illustration de la différence biocompatibilité vs toxicité (134)

En milieu aqueux acide le CHT se solubilise par la protonation de ses groupements amines ($-NH_2$) libres en groupements ammoniums ($-NH_3^+$). Cette capacité à se solubiliser en polyélectrolyte cationique lui permet d'être utilisé sous différentes formes (Figure 14) et d'interagir avec diverses molécules (129)(136)(141). Il forme notamment des liaisons électrostatiques avec les composants chargés négativement de la surface des microorganismes. Cette interaction provoque une rupture de l'équilibre de la paroi cellulaire, l'hydrolyse des peptidoglycanes et la fuite des éléments intracellulaires provoquant la mort du pathogène. Il limite aussi la croissance microbienne lorsque le pH est supérieur au pKa, grâce à sa capacité à former des liaisons hydrophobes ou à emprisonner des cations métalliques (pouvoir chélatant). Le pouvoir antimicrobien du CHT résiderait aussi dans sa faculté à pénétrer la paroi des pathogènes et à se combiner avec l'ADN et l'ARN pour inhiber la synthèse des acides nucléiques (130)(142)(143)(144). L'activité bactéricide et fongicide du CHT a été démontrée sur un large spectre de bactéries et de champignons (145).

Le DDA joue un rôle majeur dans la solubilisation du CHT. Plus il est grand, plus le nombre de fonctions amines sera important. La protonation des groupes $-NH_2$ permet ainsi d'empêcher la formation de liaisons hydrogènes entre les fonctions hydroxyles, amides et éthers responsables de l'état cristallin du polymère (139). Le poids moléculaire est aussi un

paramètre à prendre en compte. Lorsqu'il est trop bas, le CHT est très soluble et peu visqueux, ce qui limite ses applications (127). L'activité antimicrobienne sera elle aussi influencée par ces deux éléments (144). Les effets du DDA et de la MM dépendent de l'espèce bactérienne ou du type de champignon (145).

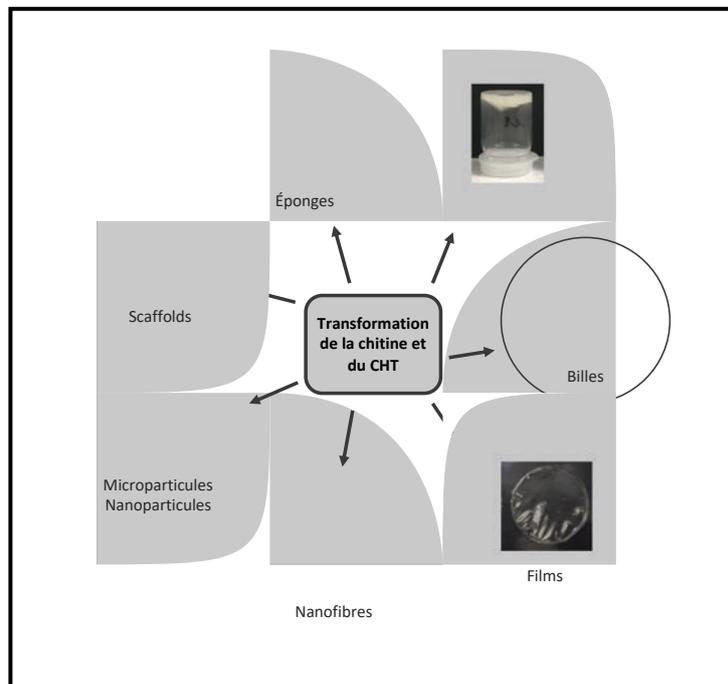


Figure 14 : Représentation s

; formes (136)

La biodégradation *in vivo* du CHT peut être chimique ou enzymatique. La voie chimique correspond à la catalyse acide dans l'estomac. Il existe plusieurs enzymes responsables de la dégradation enzymatique via l'hydrolyse des liaisons glycosidiques. Le lysozyme est la principale (137)(140)(146)(147). Il est retrouvé chez les vertébrés et est impliqué dans les mécanismes de défense contre les infections bactériennes (140)(148).

La dégradation du polymère est influencée par sa cristallinité, qui dépend de son DDA et de son poids moléculaire. Le CHT est sous sa forme cristalline maximale pour des DDA de 0 et de 100 %. Il a été montré que sa dégradation est la plus importante lorsque sa structure est désacétylée à 50 %. Pour un matériau de structure amorphe on observe une bonne capacité de gonflement et de pénétration des enzymes, et donc une dégradation plus rapide. La masse molaire affecte aussi les propriétés de gonflement. En l'augmentant on diminue le taux de gonflement, ralentissant la dégradation (146).

Sa structure chimique et sa nature cationique confèrent au CHT la capacité d'interagir avec les jonctions serrées entre les cellules épithéliales. Des chercheurs ont également montré que son effet mucoadhésif implique majoritairement des liaisons électrostatiques avec les mucines. Cette interaction est renforcée par des liaisons hydrogènes et hydrophobes (149). Ces caractéristiques sont bénéfiques pour le transport de médicaments (144). Lorsqu'il est chargé positivement, le CHT a aussi le pouvoir d'interagir avec les glycopeptides de la membrane des hématies chargées négativement, et d'intervenir dans l'hémostase (150)(151)(152).

Le CHT possède aussi de nombreuses autres propriétés biologiques particulières. Sa dépolymérisation libère des unités N-acétyl- β -glucosamine qui activent la prolifération des fibroblastes, la formation de collagène et d'acide hyaluronique pendant le processus de cicatrisation (150). Son activité pro-cicatrisante intervient aussi sur la migration des macrophages et des neutrophiles au stade précoce de la réparation tissulaire (153). Des propriétés ostéoinductrice, analgésique et antioxydante lui ont également été attribuées (119)(127)(131)(150) (155). L'ensemble de ses caractéristiques font de ce polymère un matériau de choix pour des applications biomédicales.

3.1.2.3. Les hydrogels chimiques de CHT

Les liaisons covalentes sont irréversibles et apportent une grande stabilité aux hydrogels que l'on dit réticulés. Elles sont formées par plusieurs procédés chimiques ou par formation de réseaux interpénétrants.

Les méthodes chimiques sont les plus simples pour obtenir des hydrogels permanents. Les fonctions -NH₂ et -OH disponibles du CHT sont des sites actifs permettant notamment la formation de liaisons covalentes amides, esters ou de bases de Schiff. Ces réseaux sont développés à partir de quatre voies (84)(137): 1) l'utilisation de petites molécules réticulantes telles que le glutaraldéhyde (156)(157), le formaldéhyde (158) ou la génépine (159)(160)(161) ; 2) les réaction polymère-polymère intra-chaine (base de Schiff, addition de

Michael ou pont disulfure) (162)(163) ; 3) les irradiations photo-sensibilisantes (164)(165) ; et 4) l'action d'enzymes (peroxydase) catalysantes (166).

Les réseaux interpénétrés sont issus du mélange d'un polymère enchevêtré réticulé à des monomères qui vont se polymériser pour former un maillage polymère. Le réseau est semi-interpénétré si le mélange est formé avec un ou plusieurs polymères linéaires ou branchés, et tout-interpénétré s'ils sont eux aussi réticulés (Figure 15) (84)(128)(137). A titre d'exemple, un hydrogel tout-interpénétré de CHT et d'agar ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes, a été développé par Sahiner et *al.* (120). Dans une autre étude, Li et *al.* ont fabriqué un hydrogel semi-interpénétré de CHT pour la libération de principes actifs chargés négativement (167).

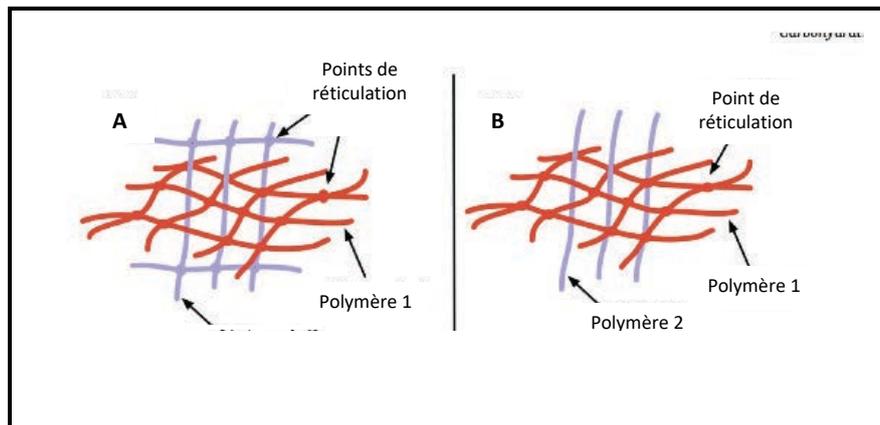


Figure 15 : Représentation schématique d'un réseau tout interpénétrant (A) et d'un réseau semi-interpénétrant (B) (168)

Ces hydrogels dont on contrôle la réticulation présentent des avantages en termes de stabilité et de résistance mécanique. Leur procédé de fabrication permet de maîtriser leur porosité. En revanche, leur production nécessite des étapes supplémentaires de modification, et leur utilisation peut avoir des effets nocifs, en raison de la toxicité des agents réticulants ou des résidus de certaines réactions (169)(170).

3.1.2.4. Les hydrogels physiques de CHT

Ils sont formés par des liaisons non covalentes et réversibles. Elles sont de types électrostatiques, hydrophobes et ou hydrogènes (Figure 16 C). La gélification ne requiert pas de molécules réticulantes toxiques ce qui rend ce type d'hydrogels très attractif pour des applications cliniques (84)(137).

Les liaisons hydrophobes se forment lors de la neutralisation du CHT. Des auteurs ont décrit des méthodes de formation de ce type d'interactions à partir de CHT solubilisé mis en solution avec de l'alcool, ou au contact d'ammoniaque à l'état gazeux (171)(172). Ces deux procédés permettent de réduire la charge ionique des groupements $-NH_3^+$ et de réduire les forces de répulsion (169).

Les propriétés cationiques du CHT lui permettent d'interagir via des liaisons ioniques avec des composés chargés négativement (Figure 16 A) tels que les ions sulfates, citrates et phosphates, et des métaux anioniques (84)(137)(128). La création de ces interactions dépend de plusieurs facteurs : la densité et la taille des agents anioniques, mais aussi le DDA du CHT, sa concentration et le pH du milieu (84)(137).

Un complexe polyélectrolyte (PEC : polyelectrolyte complex) se forme spontanément lorsqu'on mélange deux polyélectrolytes de charges opposées (polyanion et polycation) en solution (Figure 16 B) (173). Les interactions ioniques intervenant sont considérablement plus fortes que la plupart des liaisons réversibles (174). Ce type de complexe évite l'utilisation de précurseurs, d'agents réactifs ou de catalyseurs toxiques. Les PECs sont généralement très bien tolérés, biocompatibles, sensibles aux changements environnementaux et sont donc d'excellents supports pour la libération contrôlée de médicaments (175). Cette complexation ionique est très souvent accompagnée de liaisons secondaires hydrogène qui se forment grâce aux groupements hydroxyles du CHT, d'interactions hydrophobes et de Van Der Waals (173)(175). La stabilité d'un PEC dépend d'un grand nombre de paramètres comme la densité de charge, le degré d'ionisation de chaque polymère, la concentration, la distribution de leur charge, la masse molaire et le pH du milieu de réaction (175). Le CHT est un polyélectrolyte

très intéressant pour la formation de PECs. Les principaux polymères naturels anioniques avec lesquels on peut former des hydrogels avec le CHT sont: l'alginate (112), le carraghénane (176), la gomme xanthane (177) et gellane (178), l'acide hyaluronique (179) et la carboxyméthylcellulose (180). Récemment Lv et *al.* ont mis au point un hydrogel d'alginate, de carboxyméthylcellulose et de CHT par interactions polyélectrolytes pour la cicatrisation des plaies. Ils ont montré qu'avec l'ajout de CHT dans la préparation, le processus de cicatrisation était accéléré *in vivo* (112). Un autre hydrogel d'alginate et de CHT a lui aussi prouvé son efficacité chez le rat dans la même application (113). Il existe peu de données dans la littérature sur des hydrogels de CHT formés par des PECs pour la délivrance d'antibactériens et le traitement des infections. Lai et *al.*, ont élaboré un hydrogel stable par interactions ioniques entre le CHT et la carboxyméthylcellulose, puis chargé en agents antibactériens (minocycline hydrochloride et tétracycline hydrochloride) capable d'améliorer le processus de cicatrisation chez la souris (114). Une autre équipe a encapsulé de la ciprofloxacine dans un hydrogel à base de CHT et de gomme xanthane pour une application antibactérienne (177).

Les PECs de CHT peuvent aussi être utilisés pour former des microparticules, nanoparticules, comprimés, films, membranes, éponges, fibres, et textiles (173)(181).

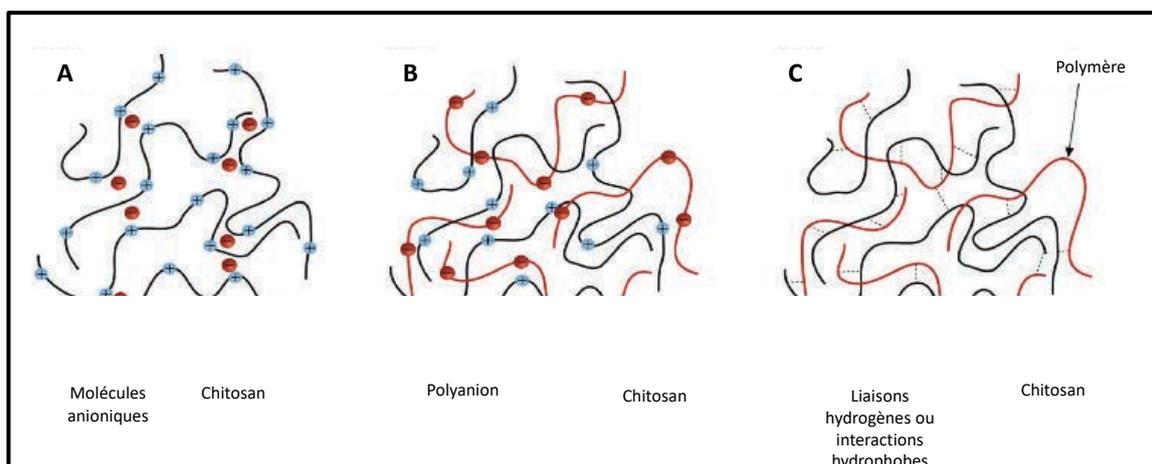


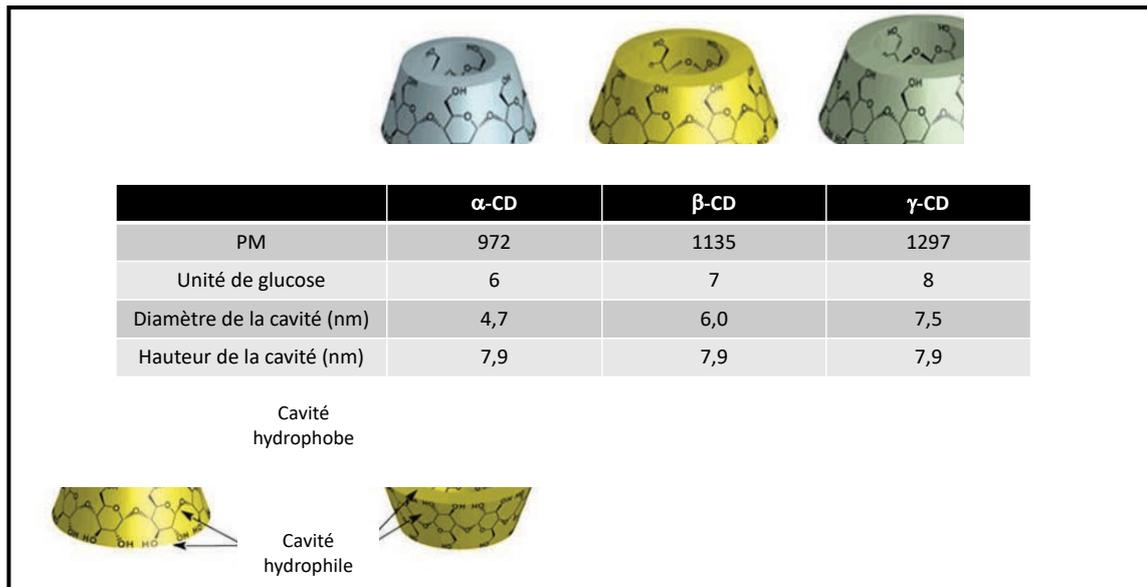
Figure 16 : Représentation schématique des liaisons physiques pour former un hydrogel physique de chitosan (168)

3.1.2.5. Les cyclodextrines et les polymères de cyclodextrines

- Les cyclodextrines

Les cyclodextrines (CDs) sont des oligosaccharides cycliques naturels dérivés de l'amidon, découvertes en 1891 par Villers (182). Elles sont composées d'unités α -D-glucopyranose liées par des liaisons α -1,4 glycosidiques (183)(184). Les formes les plus courantes sont l' α , la β et la γ CD composées respectivement de 6, 7 et 8 unités de glucose (Figure 17) (182). La molécule de CD a une structure en forme de cône creux. Sa cavité interne est hydrophobe (groupements éthers des résidus de glucose, atomes de carbones et d'hydrogènes) alors que sa surface extérieure est hydrophile par la présence de groupements hydroxyles primaires et secondaires (184). Sa solubilité peut être augmentée par des modifications chimiques telles que l'estérification, ou l'introduction de groupes fonctionnels sur les groupements hydroxyle du squelette. Une hydroxypropyl- β CD synthétisée par substitution des groupements hydroxyles par des groupements hydroxypropyles a, par exemple, montré d'excellents résultats en terme de solubilité (185).

Les CDs appartiennent à la famille des molécules cages capables de former des complexes d'inclusion « hôte-invité » (Figure 17) réversibles avec de nombreux éléments actifs lipophiles faiblement solubles. Les principales forces impliquées sont des liaisons hydrophobes, hydrogènes, électrostatiques et de Van der Waals (182)(183)(184)(186). Les applications biomédicales des CDs sont très attractives en raison de leur bonne disponibilité, faible coût, et faible toxicité et immunogénicité (183)(186)(187). Elles ont aussi une bonne résistance aux enzymes humaines (185). Ces molécules sont donc largement utilisées pour former des complexes avec des principes actifs grâce à l'interaction « hôte-invité » en sciences pharmaceutique et technologique. Leurs propriétés permettent d'augmenter la solubilité et la stabilité pour une meilleure biodisponibilité médicamenteuse, de contrôler les profils de libération de médicament, et de réduire la toxicité locale et systémique (182)(183)(188).



elles α , β et γ (Illustration des CDs d'après (189)) et formation du complexe d'inclusion avec une molécule compatible (190).

- Les polymères de cyclodextrines (PCD)

Les PCD sont synthétisés pour obtenir des matériaux avec de multiples sites d'inclusion, pour améliorer la solubilité de principes actifs destinés aux applications médicales, et pour produire des supports fonctionnels destinés à l'administration contrôlée de principes actifs (183). En fonction des conditions expérimentales, ces polymères peuvent être hydrosolubles, améliorant la solubilité des CDs non polymérisées, ou insolubles (191)(192). Ils se présentent sous différentes structures : linéaire, en étoile, polyrotaxane et réticulé (Figure 18) (185)(193)(194).

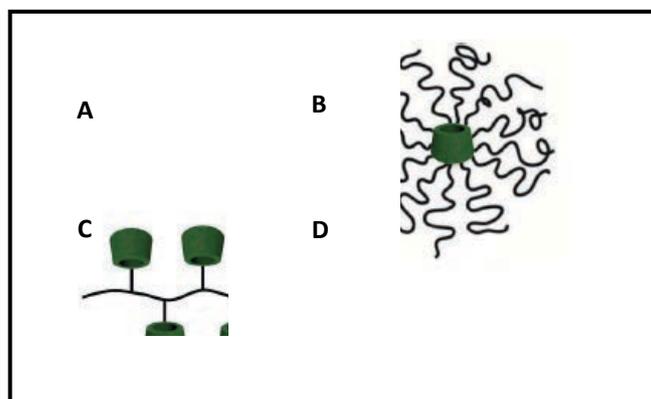


Figure 18 : (A et C) Polymères de cyclodextrines linéaire, (B) en étoile et (D) polyrotaxane (193)

Les CDs sont liées de manière covalentes dans la chaîne principale ou comme groupes latéraux (183). Les PCD linéaires peuvent être synthétisés par greffage des CDs sur un polymère linéaire, ou par polymérisation d'un monomère porteur de CDs (193). Les polyrotaxanes ou pseudorotaxanes sont obtenus par assemblage supramoléculaire grâce au complexe d'inclusion hôte/invité des CDs (195). Les polymères en étoile résultent d'une polymérisation radicalaire par transfert de chaînes réversibles (RAFT) sur les groupements hydroxyles de la β CD (193). La synthèse des PCD réticulés nécessite des agents réticulants tels que l'épichlorohydrine, les diépoxydes, les diisocyanates et l'acide citrique (185). Un polymère de β CD et d'épichlorohydrine a été développé par Gidwani et Vyas pour optimiser la délivrance de principes actifs (196). Une autre stratégie utilise le diisocyanate de toluène et le diisocyanate d'hexaméthylène pour réticuler un polymère de β CDs permettant l'inclusion du 2,4-dinitrophénol (197). L'UMET-ISP a développé différentes techniques pour former des polymères ioniques (cationique ou anionique). Junthip et *al.* ont mis au point un PCD cationique par une réaction de polymérisation de la β CD avec de l'épichlorohydrine en conditions basiques et en présence du chlorure de glycidyltriéthylammonium (198). Martel et *al.* ont décrit une méthode pour la production d'un PCD polyélectrolyte anionique. La polymérisation repose sur une réaction de polyestérification des groupes -OH de la CD et des groupes carboxyliques de l'acide citrique en présence de sodium hypophosphite (catalyseur) (Figure 19) (199). Ce poly citrate de CDs anionique constitue un excellent candidat pour la formation de PECs avec le CHT chargé positivement.

Des exemples d'hydrogels à base de PCD pour des applications médicales sont regroupés Tableau 4. Ces hydrogels sont tous destinés à la délivrance de médicaments. Les PCD sont synthétisés à partir de différents types de CDs et selon plusieurs procédés.

Tableau 4 : Hydrogels à base de plusieurs types différents de PCD pour une libération de principes actifs

:D	G	AFT	En étoile (8 bras)	22)
:D	lystérification : acide rique (-COOH) et CD (-OH)	gent réticulant : acide citrique	Réticulé	24)

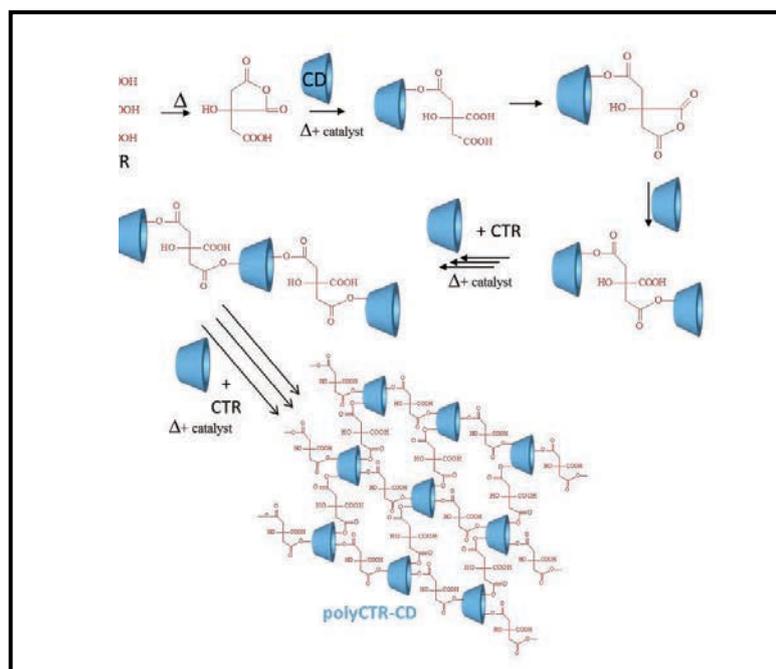


Figure 19 : Réaction de polymérisation par polyestérification entre l'acide citrique et les CDs

3.2. Les éponges

Les éponges existent naturellement dans le monde marin depuis plusieurs millions d'années. Elles sont considérées comme les représentants des premiers animaux cellulaires (205). Leur structure est superabsorbante et présente de très nombreux pores qui peuvent être interconnectés. Depuis plusieurs années la communauté scientifique s'est intéressée aux éponges naturelles ou synthétiques comme support pour la délivrance de molécules. Il existe un grand nombre d'éponges en développement notamment pour l'ingénierie tissulaire. Elles

présentent l'avantage d'être poreuses et de favoriser le passage des fluides et des cellules pour la régénération des organes. Leur capacité à gonfler présente un intérêt pour le comblement de plaies profondes, et leur pouvoir absorbant permet de les imprégner de médicaments pour une libération locale. Il existe différentes méthodes pour la formation d'une éponge :

Le « gas foaming » est largement utilisé en industrie et consiste en un mélange d'une phase solide à une phase gazeuse pour donner forme au réseau poreux (206) (Figure 20 A). Le procédé peut être adapté pour fabriquer des matrices poreuses à partir d'une large gamme de polymères naturels. L'équipe de Maniglio et *al.* a travaillé à l'élaboration d'une éponge à base de fibrinoïne par une réaction gazeuse avec du N₂O (protoxyde azote) pour l'ingénierie tissulaire (207). Une autre équipe utilise du carbonate d'hydrogène de sodium pour former un réseau poreux à partir de gélatine (208).

Dans la technique du « solvent casting particulate leaching » le polymère est dissous dans un solvant avec des sels ou des agents porogènes. Après évaporation du solvant, les pores sont formés par élimination des particules solubles (209) (Figure 20 B). Cette technique est bien connue pour la préparation d'éponges très poreuses à pores contrôlés (210). Raggio et *al.* ont par exemple mis au point une éponge de fibrinoïne de soie par la dissolution de sels de NaCl éliminés par un rinçage à l'eau (211). Cette même méthode avait aussi été employée pour développer un matériau poreux de gélatine et d'acide hyaluronique destiné à l'ingénierie tissulaire (212). Momin et *al.* ont eux utilisés du sodium d'alginate pour produire une éponge contenant du miel et du curcumin pour accélérer la cicatrisation des plaies (213).

La lyophilisation est réalisée par l'élimination des cristaux d'eau par sublimation du support (hydrogel) gelé. La sublimation est le processus qui consiste à faire passer un composé de l'état solide à l'état gazeux sans passer par l'état liquide. Cette méthode permet de réduire les dommages liés aux transformations et de préserver l'intégrité structurale et chimique du matériau (214) (Figure 20 C). De plus, la grande capacité des hydrogels à absorber leur poids en eau, rend les matériaux lyophilisés très poreux (212). Cette méthode est la plus utilisée pour former des éponges de CHT. Dans le cas du CHT, elle permet la création de pores

interconnectés qui entraînent une plus grande surface disponible. Cette surface accrue offre un espace pour le chargement de solutions médicamenteuses ou pour le passage et la fixation des cellules (214).

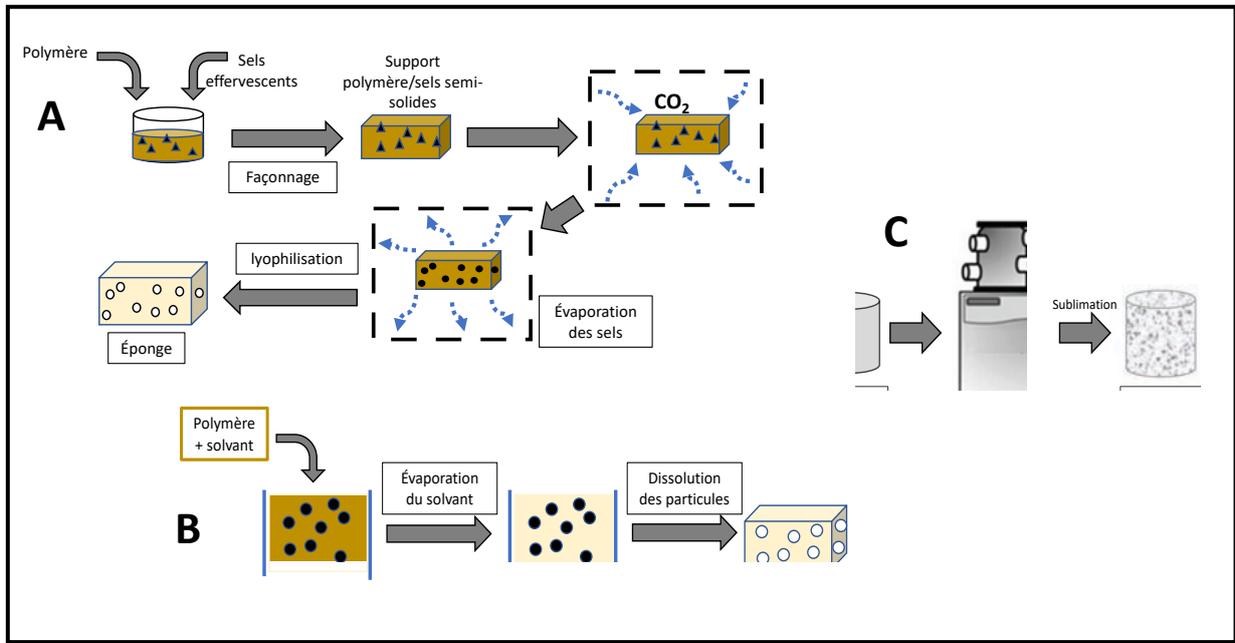


Figure 20 : Les différents méthodes de préparation des éponges à partir d'une solution de polymère (A) ; la méthode de gas foaming ; (B) ; la méthode de solvent casting particulate leaching ; (C) la lyophilisation

3.2.1. La lyophilisation

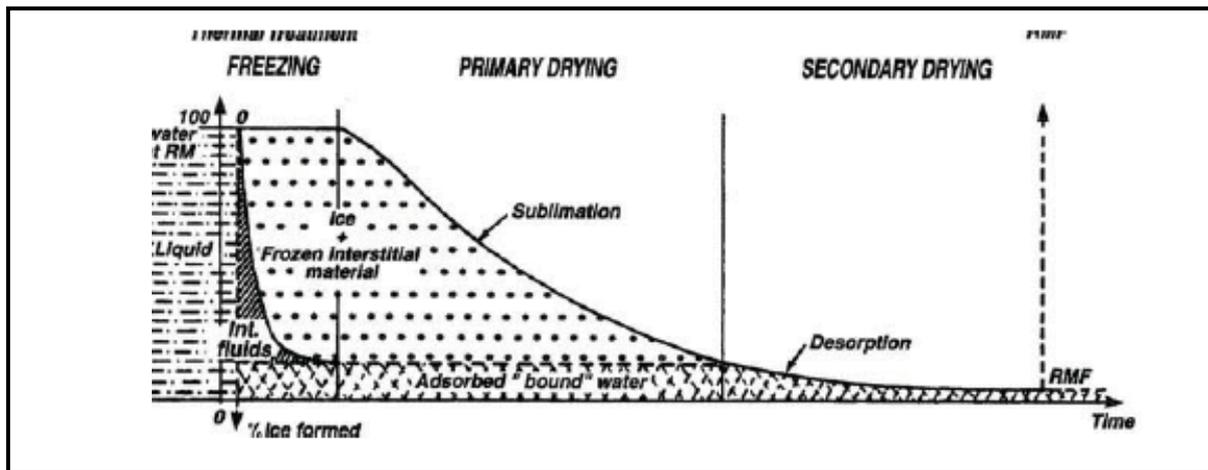
La lyophilisation est une méthode qui contrôle la déshydratation de produits par dessiccation sous vide. Des traces de l'utilisation de cette méthode ont été relevées plusieurs siècles avant Jésus Christ. C'est à la fin du 19^{ème} siècle que la technique a été industrialisée pour le traitement des produits labiles tels que les ATBs ou les dérivés du sang. Au 20^{ème} siècle, la technologie est perfectionnée pour permettre le développement de lyophilisateurs de production, utilisés dès lors dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (215).

L'eau existe sous trois états : solide, liquide et gazeux. Le passage d'un état à l'autre dépend de la température et de la pression. Il existe un point particulier : le point triple.

Autour de ce point triple, l'eau peut exister à l'état solide, liquide ou gazeux. En faisant varier la température et la pression, l'eau passe d'un état à l'autre. La lyophilisation est donc un jeu de températures et pressions qui permet d'éliminer l'eau en fonction de l'état dans lequel elle se trouve. Trois étapes (Figure 21) sont nécessaires pour lyophiliser un matériau : 1) la congélation permet de faire passer l'eau de l'état liquide à l'état solide ; 2) la dessiccation primaire, par abaissement de la pression dans l'appareil, entraîne la sublimation éliminant l'eau (passage de l'état solide à l'état gazeux) ; et 3) la dessiccation secondaire piège le reste d'eau sous la forme de vapeur sur une surface froide par condensation (passage de l'état gazeux à l'état solide). Nous avons détaillé ces étapes et décrit l'influence de leurs différents paramètres sur les caractéristiques de l'éponge :

- La congélation permet la séparation de l'eau des autres composants par la formation de cristaux de glace (passage de l'état de liquide à l'état solide) (216). Cette étape est cruciale car elle détermine la morphologie des cristaux et la microstructure du matériau. Une congélation à plus haute température est à l'origine de cristaux de plus grande taille car elle nécessite une force thermodynamique plus faible pour la nucléation de la glace comparée à un processus fait à basse température (214). Des études ont rapporté qu'entre -20 °C et -80 °C , il se forme une structure poreuse ouverte et interconnectée, alors qu'à -196 °C des cristaux en forme de feuilles parallèles sont obtenus (217). La microarchitecture dépend également de la vitesse de refroidissement (taux de perte de chaleur en fonction du temps). Lorsqu'elle est élevée, les cristaux formés sont plus nombreux et de plus petite taille, entraînant une plus grande surface spécifique de glace. Il existe différentes techniques de refroidissement, la congélation à l'azote liquide est la plus rapide (218). Les technologies de refroidissement constant ont montré une production d'éponges plus uniformes (214). La taille et la forme des cristaux de glace sont aussi dépendantes du moule/récipient de congélation. Selon sa conductivité thermique, la nucléation peut débiter sur les bords et conduire à des cristaux allongés à la périphérie de l'éponge par rapport au centre (214).

- La dessiccation primaire est la phase de sublimation de la glace. La sublimation est le passage d'un corps de l'état solide à l'état gazeux sans passer par l'intermédiaire liquide. L'échantillon est placé dans une chambre sous vide à basse température (lyophilisateur) (Figure 20 C). Les particules de glace sont alors sublimées laissant place à des espaces ou des pores créant l'architecture de l'éponge. C'est cette architecture poreuse qui confère à l'éponge sa capacité d'absorption lorsqu'elle est mise en solution (214). La sublimation ne peut être réalisée que si la pression de la chambre est inférieure à la tension de vapeur de la glace du produit (216). Les cristaux d'eau éliminés sous forme de vapeur sont retenus par piégeage sur le condensateur, à une température inférieure à celle du produit ($< -50\text{ °C}$) (218). Le taux de sublimation est la masse de glace sublimée par unité de temps. Il est proportionnel à la différence de pression entre la pression de vapeur de la glace et la pression partielle d'eau dans la chambre, qui est sensiblement la même que celle de la chambre de la dessiccation primaire. À une température donnée, une pression faible donne un taux de sublimation plus élevé. Cependant, une pression trop faible peut entraîner une hétérogénéité de transfert de chaleur et donc entraîner une plus grande hétérogénéité entre les échantillons (218).
- La dessiccation secondaire soumet les produits à une température qui augmente pour arracher les molécules d'eau restantes et piégées lors de l'adsorption. L'adsorption est la fixation de ces molécules dans les couches sèches des échantillons lorsqu'elles s'échappent au cours de la dessiccation primaire (215). L'eau résiduelle est éliminée par désorption pour atteindre un niveau optimal de teneur humide, généralement inférieur à 1 %. La pression n'a pas d'influence sur cette deuxième phase de séchage. Il n'est donc pas nécessaire de modifier la pression en phase primaire et phase secondaire (218).



3.2.2. Caractérisation des éponges

3.2.2.1. La porosité

Un pore agit comme un passage entre les surfaces externe et interne d'un support, permettant la pénétration dans, à travers ou à l'extérieur du solide. Il existe diverses formes de pores. Un pore ouvert est connecté à la surface externe d'un solide et permettra le passage d'un liquide ou d'un gaz à travers le solide, contrairement à un pore fermé qui est un vide isolé dans le solide. Le troisième type de pore relie différentes parties de la surface externe à la microporosité interne. L'ensemble de ces pores peut être plus moins interconnecté. Leur taille permet de les classer en micropores (< 2 nm), mésopores (2 – 5 nm) et macropores (> 50 nm) (220).

Les supports poreux sont utilisés dans les produits pharmaceutiques à de nombreuses fins, notamment la mise au point de nouveaux systèmes d'administration de médicaments pour une libération prolongée. Ces matériaux possèdent une grande quantité de pores permettant l'inclusion de principes actifs et une libération de façon prédictible et reproductible (220). La taille des pores, leur architecture et le volume poreux auront donc un impact sur la capacité d'imprégnation et de libération du dispositif (221). Il a été montré que plus la surface poreuse est grande, plus la capacité d'adsorption et d'absorption sont importantes (222)(223). En corrélation avec une autre étude, Ikeda et *al.* ont aussi démontré que cette porosité influence

les propriétés mécaniques d'une structure poreuse. En l'augmentant, on diminue la résistance à la compression ou à la tension (224)(225). La porosité joue également un rôle sur les propriétés de gonflement des matériaux poreux. En faisant varier le volume et la taille des pores de leur structure tri-dimensionnelle à base de fibrinoïne de soie, Kim et *al.* ont mis en évidence l'impact de la porosité sur son gonflement (226).

La porosité d'un matériau peut être évaluée par différentes techniques d'imagerie. La microscopie électronique à balayage (MEB) utilise un fin faisceau d'électrons émis par un canon. Ce faisceau est focalisé par des lentilles électromagnétiques sur l'échantillon couvert d'une couche de carbone conductrice. L'interaction entre les électrons et l'échantillon provoque la formation d'électrons secondaires de plus faible énergie qui sont amplifiés, détectés et convertis en un signal électrique. Après un balayage de l'échantillon par le microscope, l'ensemble des signaux fournit une information sur la topographie du matériau, et permet d'obtenir une image en relief. La microtomographie par rayons X (μ -CT) permet la reconstruction d'images en trois dimensions de la structure d'un objet à partir de radiographies à deux dimensions. Une radiographie est une image 2D en niveaux de gris liés à l'atténuation du faisceau de rayons X par les différents reliefs et composants de l'objet. Les différents niveaux de gris correspondent aux différents niveaux d'absorption des rayons X. À l'aide de ces données, une image numérique est calculée et reconstruite mathématiquement. Cette technique d'imagerie permet d'accéder au cœur de la matière pour en apprécier les variations d'absorption radiologique et les différences de composition.

3.2.2.2. *Les propriétés mécaniques*

Il est essentiel d'évaluer les propriétés mécaniques d'un matériau implantable. En fonction de son lieu d'insertion et de son application, le dispositif médical doit répondre à différents critères mécaniques. Ces critères sont définis par le module de Young (exprimé E), la résistance à la traction, la contrainte à la rupture et la résistance à la compression (227).

Le module de Young (ou module élastique) représente la rigidité ou la capacité d'un matériau élastique à résister à une déformation sous une contrainte appliquée. Il est

caractérisé par l'équation $E = \frac{\sigma}{\epsilon}$ où σ est la contrainte de déformation et ϵ la déformation. La contrainte est exprimée en Pascal et correspond au ratio de la force (F) en Newton sur la surface (A) en m². La déformation ou le déplacement est adimensionnelle (228).

Il existe différentes techniques permettant de mesurer le module de Young ; les plus fréquemment réalisées sont les tests de tension ou de compression, et d'indentation (227)(228). Dans le cadre de notre application clinique, nous avons évalué les propriétés mécaniques de l'éponge par un test de compression uni-axial (Figure 22). Les matériaux à base de polymères poreux montrent un profil typique de contrainte-déformation en 3 domaines. Un domaine initial linéaire et élastique pour une déformation de 5 à 10 %, suivie d'un plateau pour des déformations d'environ 50 %, et enfin un domaine de densification due à la compression des pores (229). Le module de Young est calculé à partir de la région linéaire (228)(230)(231).

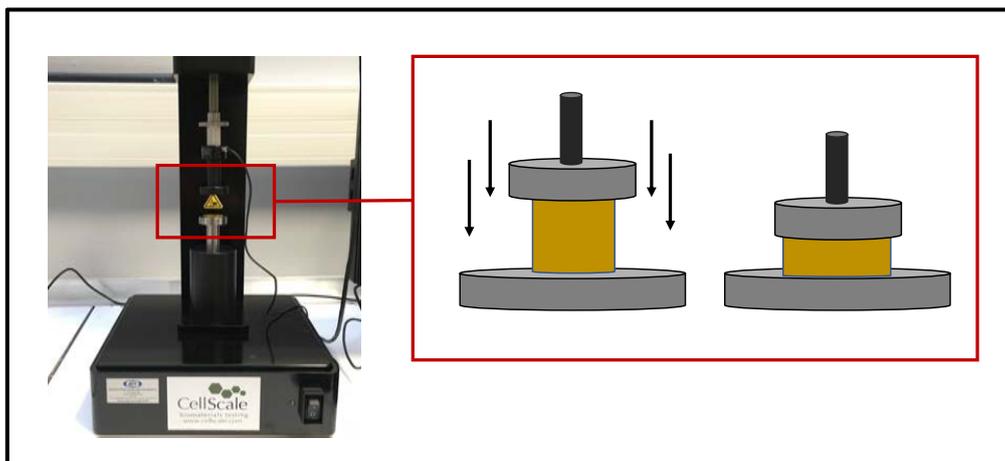


Figure 22 : Schéma d'un test de compression sur un appareil CellScale Univert

Les propriétés mécaniques d'un matériau sont influencées par sa porosité, et par les types de liaisons qui stabilisent ses chaînes de polymères. Il existe peu d'investigations s'intéressant aux effets de ces différents facteurs. Une étude a montré que la résistance mécanique est meilleure pour des pores de petites tailles avec une distribution uniforme. Il se forme alors un équilibre entre les parois plus épaisses, qui améliorent la répartition à la contrainte appliquée, et le vide (pores) qui a un rôle de barrière contre la propagation des fissures (226). La

déformation étant concentrée aux interfaces des pores, une matrice tri-dimensionnelle ayant une distribution poreuse non homogène sera donc moins résistante (232). Lin-Gibson et *al.*, en contradiction avec ces résultats, ont constaté une amélioration des propriétés mécaniques lorsque la taille des pores est augmentée (233). Ces propriétés vont également être conditionnées par la force des liaisons entre les composés du réseau. Les liaisons covalentes sont les plus fortes et apporteront donc une meilleure stabilité. Il existe des méthodes de modifications chimiques et physiques pour renforcer cette stabilité. Un des moyens est l'application d'un traitement thermique, qui entraîne la création de liaisons covalentes. Le CHT peut notamment réticuler sur lui-même lorsqu'il est soumis à des températures de 120 °C (234). L'influence du traitement thermique sur l'amélioration de la résistance mécanique d'une matrice de chitosan a été mis en évidence par Ji and Shi (234).

3.2.3. Les éponges de chitosan à libération d'antibiotiques

De nombreuses équipes travaillent à l'élaboration de dispositifs médicaux sous la forme d'éponges pour la libération locale d'ATBs dans des plaies. L'ensemble des études est regroupé Tableau 5.

Tableau 5 : Éponges antibactériennes de CHT faisant l'objet de recherches pour la libération locale d'antibiotiques

Composants	Obtention	Antibiotique	Application	Référence
CHT Carboxymethylcellulose de sodium	Lyophilisation	Imprégnation dans une solution de gentamicine	Action bactériostatique locale (<i>E.coli</i>)	(235)
CHT	Lyophilisation	Imprégnation à partir de solutions d'amikacine et/ou vancomycine	Traitement prophylactique : prévention de la formation du biofilm dans les infections musculo-squelettiques. Étude in vivo (souris) de la prévention de la formation de biofilm sur cathéter	(236)
CHT	Lyophilisation	Mélange des poudres de vancomycine, ciprofloxacine ou céfuroxime à la poudre de CHT pour former une éponge déjà chargée	Traitement prophylactique : prévention des infections ostéo-articulaires sur matériel	(237)
CHT	Lyophilisation	Mélange des poudres d'amikacine ou de	Traitement des infections musculo-squelettique (modèle animal : chèvre)	(238)

		vancomycine à la poudre de CHT pour former une éponge déjà chargée		
CHT Agent réticulant génipine	Lyophilisation	Imprégnation à partir de solutions d'amikacine et/ou vancomycine	Traitement des infections traumatiques musculo-squelettiques	(239)
CHT	Lyophilisation	Imprégnation à partir de solution d'amikacine ou de vancomycine	Traitement prophylactique : prévention des infections musculo-squelettiques après chirurgie ou traumatisme	(240)
CHT APTES (3-Aminopropyltriéthoxysilane) Agent réticulant génipine	Lyophilisation	Incorporation d'une solution d'ampicilline dans la solution de CHT	Cicatrisation d'une plaie superficielle infectée	(241)
CHT βPCD Agent réticulant génipine	Lyophilisation	Imprégnation à partir d'une solution de ciprofloxacine	Pansement pour des plaies infectées	(61)
CHT (Sentrex BioSponge, Bionova Medical, Germantown, TN)		Imprégnation à partir d'une solution de tobramycine ou de doxycycline	Traitement de l'infection du pied diabétique sans biofilm	(242)
CHT Acrylate de 2-hydroxyéthyle Persulfate de potassium	Lyophilisation	Incorporation de lévofloxacine API dans la solution de CHT/ acrylate de 2-hydroxyéthyl/ persulfate de potassium	Traitement des plaies infectées	(243)
CHT + Polyéthylène glycol	Lyophilisation	Imprégnation à partir d'une solution de vancomycine et/ou d'amphotéricine B	Traitement préventif pour la formation du biofilm des lésions musculo-squelettiques des extrémités	(244)
CHT	Lyophilisation	Imprégnation à partir d'une solution de doxycycline	Action antibactérienne (<i>E.coli</i> et <i>S.aureus</i>)	(245)
CHT	Évaporation du solvant	Norfloxacine	Traitement des plaies infectées ou à risque d'infections	(246)
CHT ± Polyéthylène glycol	Lyophilisation	Imprégnation dans une solution de ciprofloxacine et de rifampicine	Prévention de la formation du biofilm dans les lésions musculo-squelettiques des extrémités	(247)

Il existe une seule investigation pour le traitement des infections du pied diabétique. Les autres études sont majoritairement focalisées sur la prévention de l'infection plutôt que sur son éradication, et les applications sont limitées à des infections musculo-squelettiques non profondes. Les ATBs souvent utilisés sont la vancomycine et l'amikacine, or leur diffusion dans l'os est connue pour ne pas être optimale (248)(249). Pour des infections ostéo-articulaires qui touchent les extrémités des patients diabétiques, le choix de l'antibiothérapie s'orientera vers des molécules avec une bonne pénétrance dans l'os, comme les fluoroquinolones, les cyclines ou la rifampicine (248). La rifampicine est un des agents puissants contre le biofilm.

Sa bonne pénétrance et son activité bactéricide en font une molécule de choix pour ce type d'infections (250). Le caractère poly-microbien des infections ostéo-articulaires nécessite l'utilisation d'ATBs en bithérapie. L'association d'une fluoroquinolone à la rifampicine permettrait d'avoir une action complète sur tout le spectre de bactéries et une bonne diffusion dans l'os pour les infections profondes. Ce couple d'ATBs bactéricides est largement utilisé dans les infections ostéo-articulaires.

- Les fluoroquinolones (ciprofloxacine, lévofloxacine, ofloxacine, loméfloxacine, péfloxacine, moxifloxacine)

Les fluoroquinolones sont des ATBs bactéricides. Leur activité résulte de l'inhibition de la topo-isomérase II (ADN-gyrase) et de la topo-isomérase IV, nécessaires à la réplication, la transcription, la réparation et la recombinaison de l'ADN bactérien. Elles possèdent un très large spectre sur les aérobies Gram+ (dont les staphylocoques Méti-S) et Gram- (dont les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*). Leurs principaux effets indésirables lors de l'administration par voie générale sont les arthro-myalgies et/ou tendinopathies achilléennes, l'altération des cartilages de conjugaison chez les enfants, la phototoxicité, les nausées, les douleurs digestives, les vomissements et la diarrhée. En application locale, ces effets secondaires sont très réduits (251)(252).

- La rifampicine

La rifampicine est un antituberculeux majeur, bactéricide, de la famille des rifamycines. Son mécanisme d'action repose sur la formation d'un complexe stable avec l'ARN polymérase des bactéries. Elle est active sur de nombreux germes aérobies Gram+ (dont les staphylocoques Méti-S, Méti-R, à coagulase négative et les streptocoques), Gram-, et quelques anaérobies. Les entérobactéries sont en revanche des espèces résistantes à cet ATB, d'où l'importance de l'utiliser en bithérapie dans les infections sévères polymicrobiennes. La rifampicine entraîne la coloration orangée des urines, des selles, des

larmes et des lentilles cornéennes. Elle provoque aussi de rares nausées et vomissements qui cèdent à la prise au cours d'un repas (253)(252).

3.3. Les travaux du laboratoire à base du mélange de CHT et de PCD

Les laboratoires UMET-ISP et U1008 ont développé plusieurs procédés pour la création de systèmes polyélectrolytes de CHT et PCDs (Figure 23) :

Martin et *al.* ont mis au point un système multicouches « layer-by-layer » à partir d'un textile de polyéthylène téréphtalate (PET). Le processus consiste en un trempage ou « dip coating » du textile dans des solutions de polyélectrolytes de CHT et PCDs. Le but est de concevoir un système de réservoir pour la libération prolongée de principes actifs tels que l'acide 4-tert-butylbenzoïque et le bleu de méthylène (254)(255). Les travaux de Aubert-Viard et *al.* ont permis de fonctionnaliser, par la même stratégie, le textile avec de la chlorhexidine pour une application antibactérienne (256). Une stabilisation du système multicouche après un traitement thermique à 140 °C et une activité prolongée jusqu'à 7 jours ont été observées. Mogrovejo-Valdivia et *al.* ont repris cette technique de fonctionnalisation avec de l'argent en y incorporant de l'ibuprofène pour avoir une action antibactérienne et antalgique (257)(258). Le textile riche en fonctions carboxyliques permet la fixation de l'argent. Le système multicouche polyélectrolyte (CHT et PCDs) diminue la diffusion de cet argent qui est toxique à haute concentration, tout en maintenant son efficacité sur la croissance bactérienne. Le « layer-by-layer » a aussi été utilisé par Perez-Anes et *al.* pour modifier une surface métallique en titane par un assemblage de couches de CHT-PCD pour la libération prolongée de gentamicine (259). L'évaluation microbiologique du dispositif a montré une activité antibactérienne jusqu'à 6 jours sur *S. aureus*, démontrant ainsi la pertinence de ce système dans la conception d'un dispositif à libération de médicaments pour le traitement des infections orthopédiques.

Une autre approche a suscité l'intérêt de nos groupes : la formation de nanofibres électrofilées de CHT et de PCD libérant du triclosan pour une application antibactérienne. Le Dr Ouerghemmi a montré que les nanofibres fonctionnalisées par le PCD permettaient une

libération contrôlée et une activité antibactérienne prolongée du principe actif comparativement à l'utilisation de mono CD (260). Le procédé est actuellement repris dans le cadre d'une thèse afin de fonctionnaliser des stents imprégnés de simvastatine pour la prévention de la resténose artérielle. Ce projet s'inscrit dans un projet Interreg transfrontalier IMODE (Innovative MultiComponent Drug dEsign) (<http://www.project-imode.eu/the-project/>)

Plus récemment des hydrogels et des éponges de CHT et de PCDs ont été élaborés. Un long travail d'analyse de la granulométrie des poudres des composants et de leurs ratios a permis d'élaborer une méthode brevetée pour former un hydrogel physique à base d'un complexe polyélectrolyte par le Dr Flores (110)(261). Après lyophilisation de cet hydrogel, les éponges obtenues ont été imprégnées de ciprofloxacine, et leur activité antibactérienne a été testée dans l'intention de concevoir un dispositif médical à libération locale d'ATB pour le traitement de plaies infectées (61). Ces supports ont aussi fait l'objet d'une étude par le Dr Palomini-Durand pour favoriser la régénération osseuse en cas de défauts. Les éponges ont montré, après un traitement thermique à 160 °C, un excellent gonflement, une dégradation modérée après 21 jours et une porosité favorable pour une application en ingénierie tissulaire osseuse. L'étude de la cytocompatibilité par contact direct a démontré que ces éponges étaient capables d'agir comme bio-support pour l'adhésion et la prolifération des préostéoblastes et cellules endothéliales. L'incorporation de VEGF a montré des effets pro-proliférant et pro-migratoire des cellules endothéliales. Une étude parallèle a été menée sur la formation d'hydrogel avec du PCDs insoluble pour améliorer leurs propriétés rhéologiques et leur stabilité à l'injection. Aux formulations de ces éponges et hydrogels peut être ajouté de l'hydroxyapatite pour améliorer les propriétés mécaniques et ostéoconductrices (204)(109).

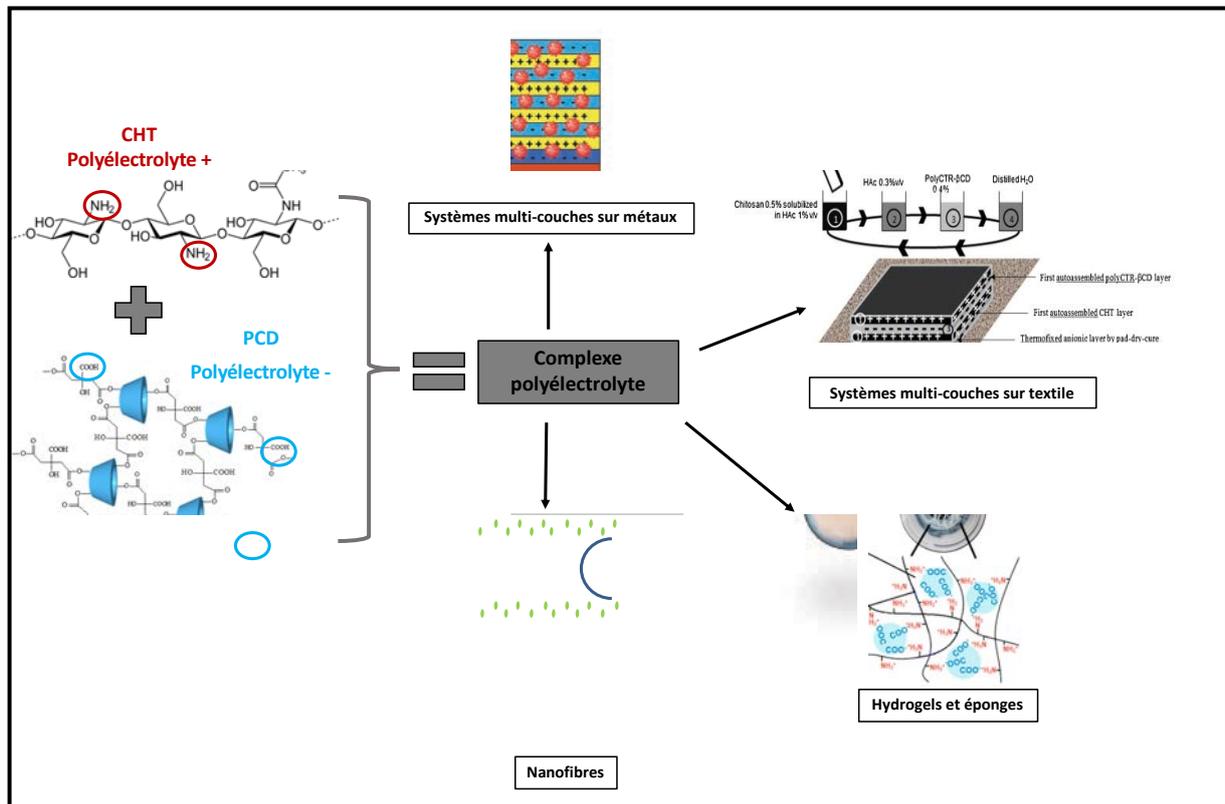


Figure 23 : Ensemble des systèmes polyélectrolytes de CHT et de PCD développés au laboratoire (254)(198)(257)(260)(204)

3.4. Conclusion

Les hydrogels pour la délivrance locale de médicaments font l'objet d'une recherche active depuis plusieurs années. Leurs préparations par voie physique à partir de polymères naturels les rendent particulièrement intéressants car elles évitent l'utilisation d'agents réticulants cytotoxiques. Le CHT, polymère cationique, possède des propriétés intrinsèques biologiques attractives par sa capacité à des hydrogels à base de PECs lorsqu'il est combiné à un polymère anionique. Les travaux antérieurs de l'équipe sur le PCD chargé négativement ont montré la possibilité de former des PECs stables grâce au mélange de CHT et du PCD. Les CDs sont des molécules cages permettant l'inclusion d'agents actifs afin de contrôler leur profil de libération cinétique dans le temps. La formulation d'un hydrogel physique de CHT et de PCD constitue donc un support intéressant non toxique, présentant une capacité d'adsorption et de libération prolongée de la molécule piégée.

Dans le cadre d'une application pour le traitement des infections du pied diabétique, les hydrogels lyophilisés *i.e* éponges semblent être les mieux adaptés. Les éponges peuvent être utilisées pour combler les défauts qui peuvent être très importants dans ce type d'infection. Après son hydratation dans une solution d'ATB, le dispositif imprégné est introduit dans la plaie et libère les médicaments localement sur toute la surface infectée. La taille et la forme des éponges peuvent être adaptées aux dimensions de tout type de plaie pour les protéger des agressions extérieures. De plus, elles constituent un support très maniable en cas de besoin de changement du pansement. Les ATBs doivent être associés pour couvrir l'ensemble du spectre bactérien retrouvé dans ce type d'infections ostéo-articulaires caractéristiques du patient diabétique. La rifampicine constitue un médicament de choix car elle possède une excellente pénétrance dans les os, et une bonne action sur les biofilms. Les entérobactéries sont en revanche insensibles à son mécanisme d'action. Elle doit donc impérativement être utilisée en bithérapie. Les ATBs de la famille des fluoroquinolones sont de bons candidats puisqu'ils diffusent eux aussi très bien dans l'os, et leur spectre d'activité bactéricide est complémentaire à celui de la rifampicine.

4. Contexte, objectifs de la thèse et cahier des charges

4.1. Contexte et objectifs de la thèse

Ce travail de thèse s'articule autour du développement d'un dispositif médical sous la forme d'une éponge pour le traitement des infections du pied diabétique. Dans un contexte où le diabète est une maladie devenue un problème de santé publique en constante augmentation, il est indispensable d'améliorer la prise en charge de ses complications. La communauté scientifique s'intéresse beaucoup à la prévention des DFIs et à l'amélioration de la cicatrisation de ces plaies. Il existe peu d'études pour le développement de nouveaux moyens de traitement de l'infection installée. Ces infections sont particulièrement difficiles à soigner en raison de la mauvaise pénétrance des ATBs au site infecté. Elles engendrent de longues hospitalisations, de nombreux soins et un risque majeur d'amputation qui diminuent la qualité de vie des patients et génèrent des dépenses de santé importantes. Les chercheurs s'efforcent de mettre au point de nouveaux systèmes qui permettent la libération locale des ATBs. En augmentant la concentration des médicaments localement, on facilite l'éradication des pathogènes en évitant la sélection de mutants résistants et en diminuant le risque d'effets secondaires toxiques pour l'organisme. Le dispositif développé au sein de notre laboratoire est un hydrogel lyophilisé *i.e* éponge de CHT et de PCD. Les éponges sont des supports très maniables car leur forme et leur taille peuvent être adaptées à tous types de plaies. Elles peuvent être commercialisées sous forme de gros blocs à découper selon les besoins de l'équipe médicale. Leur capacité à gonfler permet aux soignants de les imprégner dans la solution d'ATBs de leur choix, juste avant l'insertion. Il existe déjà des éponges de CHT sur le marché pour des applications biomédicales. La particularité de celle conçue dans notre laboratoire est le mélange avec le PCD qui par le biais de ses CDs permet l'inclusion de principes actifs pour une libération contrôlée. La méthode de préparation de l'hydrogel lyophilisé de CHT et de PCD a été élaborée au cours d'un précédent travail de thèse au sein du laboratoire (Dr Flores). Notre but est d'optimiser cette étude pour créer un support antibactérien stable et performant.

La première partie de cette thèse sera axée sur la conception et l'optimisation des éponges. Nous travaillerons avec plusieurs formulations (ratios CHT:PCD), qui se différencient par la quantité de PCD. Notre but est de déterminer le meilleur des ratios et d'évaluer la nécessité d'un traitement thermique pour stabiliser la matrice. La gélification et la force des interactions entre les deux polymères du système feront l'objet d'une première analyse rhéologique. Pour caractériser et perfectionner les éponges, des tests seront réalisés pour examiner leurs propriétés mécaniques et de gonflement. L'étude sera approfondie par une analyse de leur microstructure et de leur stabilité par un test de dégradation. La cytocompatibilité sera enfin évaluée avec des cellules ostéoblastes. A l'issue de cette première partie, les éponges les plus performantes seront sélectionnées.

La deuxième partie est consacrée à une étude de l'absorption et de la libération des éponges imprégnées de CIP et de RFP. Les effets du temps et de la concentration d'imprégnation seront examinés afin de déterminer les conditions d'imprégnation optimales en fonction de l'ATB fixé et du ratio. Dans cette partie nous étudierons également le type d'interactions impliquées dans l'adsorption des ATBs sur l'éponge.

Une évaluation microbiologique *in vitro* des éponges chargées en ATBs sera finalement réalisée. L'activité antibactérienne est dans un premier temps évaluée grâce à des tests de diffusion sur géloseensemencée. Si l'échantillon imprégné possède une activité antibactérienne, il se formera une zone, ou cercle d'inhibition reflétant l'arrêt de la croissance bactérienne. Des *Kill Time* seront alors réalisés pour explorer la capacité des éponges à entraîner une réduction bactérienne en fonction du temps. Ces tests permettent d'étudier également la cinétique à laquelle les échantillons inhibent la prolifération des bactéries.

4.2. Cahier des charges

Notre dispositif médical est un pansement antibactérien destiné à être implanté pour une courte durée (maximum 3 jours) chez les patients ayant une infection du pied diabétique. Dans le cadre de ce travail, ce pansement imprégné d'ATBs est un dispositif médical de classe

III au regard de l'annexe VIII du règlement MDR 2017/745 de la réglementation européenne. Un cahier des charges (Tableau 6) a été établi pour valider son innocuité et ses performances.

Tableau 6 : Cahier des charges des éponges antibactériennes pour le traitement des infections du pied diabétique

Propriétés	Objectifs	Méthodes d'évaluation
Viscoélastique	L'hydrogel avant lyophilisation doit se comporter comme un solide viscoélastique	Étude rhéologique
Porosité	Contrôle de la porosité	Microcopie électronique à balayage et microtomographie par rayons X
Biocompatible	Ne pas induire de toxicité cellulaire	Étude de la cytocompatibilité selon la norme ISO 10993-5
Propriétés mécaniques	Manipulation et mise en place facile du dispositif médical	Tests mécaniques de compression
Stabilité	Intégrité du dispositif médical plusieurs jours après l'insertion dans la plaie	Étude de la dégradation dans le PBS pH 7,4 en présence de lysozyme
Antibactérien	Activité antibactérienne après imprégnation dans une solution d'antibiotiques	Évaluation de l'activité antibactérienne par des tests de diffusion (<i>Kirby Bauer</i>) et de cinétique de réduction bactérienne (<i>Kill Time</i>)
Stérilisable	Absence de microorganismes après stérilisation	Stérilisation par rayons gamma selon la norme ISO 11137 et tests microbiologiques

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

1. Matériels

1.1. Le chitosan (CHT)

Le CHT utilisé est issu de la désacétylation de la chitine de la carapace de crustacés (lot : STBG1894V, Sigma Aldrich (France)). Ses propriétés physico chimiques ont été déterminées au laboratoire par différentes méthodes et sont regroupées dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Propriétés du CHT (lot STBG1894V, Sigma Aldrich)

Propriétés	Méthodes de caractérisation	Valeurs
Degré de désacétylation, %	Infra Rouge	74,62 %
	RMN-H ¹	73,31 %
Masse molaire, kDa	Viscosimétrie capillaire	150 KDa
	GPC	190 KDa (indice de polydispersité 1,7)
Viscosité η , cps	Rhéologie	277 cps

1.2. Le polymère de cyclodextrines soluble (PCD)

Le PCD a été synthétisé par la méthode développée et brevetée par l'UMET-ISP. Il est issu de la réaction d'estérification entre l'acide citrique (CTR, Sigma Aldrich, France) et la β CD (CD, Roquettes, France) en présence d'hypophosphite de sodium utilisé comme catalyseur (Sigma Aldrich, France) (199)(262). Après solubilisation des produits CD/catalyseur/CTR dans les proportions 10/3/10 (pour 100 g d'eau), l'eau est éliminée dans un évaporateur rotatif (Rotavapor®, Büchi, Suisse) à 140 °C sous vide pendant 90 min. La partie solide est traitée à 140 °C pendant 90 min, sous vide, pour former le polymère. Le solide est ensuite dispersé dans l'eau à l'aide d'un entonnoir en verre fritté. La fraction insoluble du polymère (PCDi) est obtenue après séchage à 90 °C pendant une nuit. La fraction soluble (PCD) est concentrée et purifiée par dialyse (Spectr/Por®, MWCO 20 kDa, France) puis lyophilisée (Alpha 1-2 LDplus

Christ®, Allemagne) à 0,06 mbar et -53 °C. Le rendement de la synthèse du PCD est de 41 %, sa masse molaire déterminée par chromatographie d'exclusion de taille (SEC) est de 20 kDa, et son pourcentage en masse de CDs est de 58 % (RMN- H^1). Nous utiliserons uniquement le polymère de cyclodextrine soluble dans cette étude (PCD).

1.3. La ciprofloxacine (CIP)

La ciprofloxacine (Figure 24) est un antibiotique de la famille des fluoroquinolones. Les éponges sont imprégnées dans la CFX disponible sous la forme d'une solution liquide pour perfusion (Ciflox®, 200 mg/100 mL, Fresenius Kabi, France). La poudre d'hydrochloride de ciprofaxacine (Fagron, Allemagne) est utilisée pour la gamme étalon.

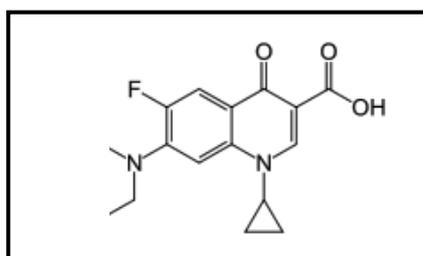


Figure 24 : Représent

ie (263)

1.4. La rifampicine (RFP)

La poudre de rifampicine (Figure 25) est disponible sous la forme d'une poudre lyophilisée (600mg) pour perfusion (Rifadine®, Sanofi, France). Elle est reconstituée avec de l'eau ultrapure, et est utilisée pour imprégner les éponges et réaliser les gammes étalons.

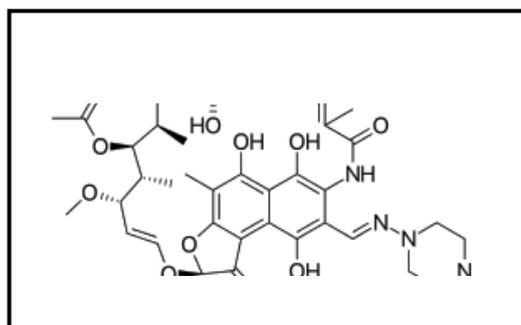


Figure 25 : Représentation moléculaire de la rifampicine (264)

2. Méthodes

2.1. Préparation des hydrogels lyophilisés de CHT et de PCD

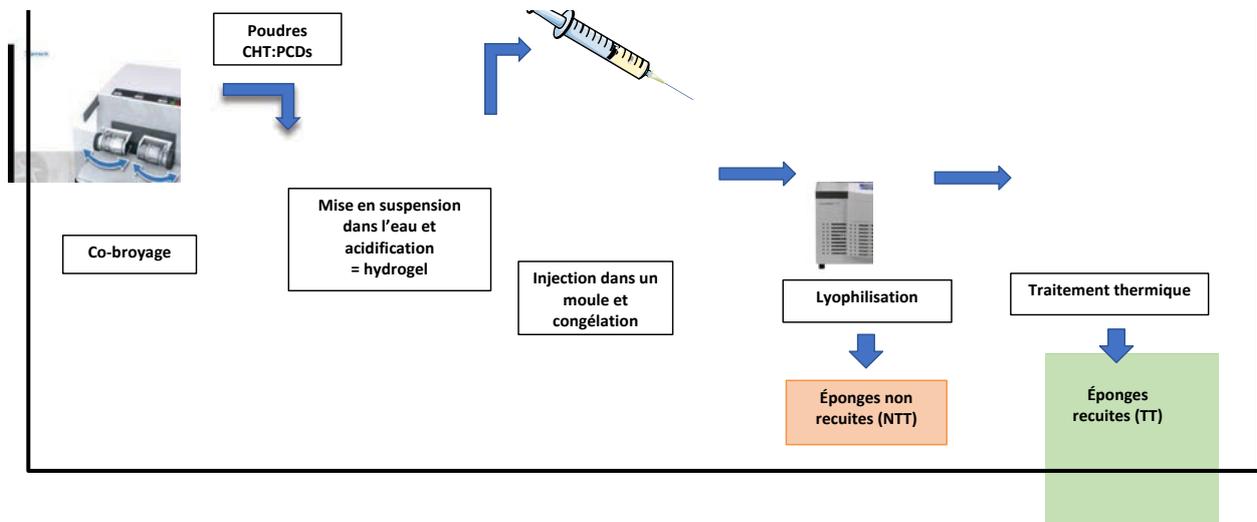
Les poudres de CHT et de PCD sont préalablement broyées afin, d'obtenir des particules de taille identique. Le CHT est dans un premier temps broyé dans un broyeur rapide à rotor (Pulvérisette 14 Fritsch, Allemagne) à raison d'un cycle de 2 min à 8000 rpm. Le PCD est quant à lui broyé dans un mortier. Les poudres ainsi obtenues sont ensuite tamisées séparément à l'aide d'un tamis avec une taille de maille de 125 μm .

2.2. Préparation des hydrogels lyophilisés

La première étape pour la préparation des hydrogels consiste à co-broyer à sec les poudres de CHT et de PCD grâce à un vibro-broyeur (MM 400, Retsch, Allemagne) à 10 Hz pendant 3 min. Les poudres sont mélangées à différents ratios de CHT:PCD qui se différencient par leur quantité de PCD (Tableau 8). Les poudres sont mises en suspension dans de l'eau ultrapure et mélangées 1,5 minutes, à l'aide de deux seringues connectées par un connecteur luer-lock femelle-femelle (Vygon®, France). L'acide acétique glacial (grade HPLC Merck, France) est ajouté par ce même système de seringues et mélangé pendant 1 minute et 30 secondes. L'hydrogel obtenu est ensuite injecté dans un tube à centrifuger (15 mL, \varnothing 12 mm, Thermo Fisher Scientific, France) congelé 12 heures à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ puis lyophilisé à 0,056 mBar, $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 48 heures (lyophilisateur Christ 1-4 LDplus, Allemagne). Pour chaque ratio, la moitié des éponges est soumise à un traitement thermique dans un four Poupinel UFP600 (Memmert, France) 1, 5 heures à $140\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le comportement des éponges traitées thermiquement (TT) et non traitées thermiquement (NTT) sera comparé au cours des expérimentations. Les étapes de productions sont résumées dans la Figure 26. Les échantillons obtenus sont découpés en disques de différents diamètres et hauteurs, selon les besoins des expérimentations. Pour certaines études, un poinçon à biopsie (Kai Medical, France) a été utilisé pour obtenir des éponges de 5 mm de hauteur et 6 mm de diamètre.

Tableau 8 : Formulation des hydrogels CHT:PCD d'hydrogel étudiés, AcOH = acide acétique

	3	3	93	1



2.3. Caractérisation des hydrogels

2.3.1. Test du flacon retourné

La gélation a été étudiée par le test du flacon retourné (265). Un hydrogel frais (1,5 mL) est immédiatement injecté dans un flacon en verre (10 mL) qui est retourné pendant 3 min pour évaluer si l'hydrogel s'écoule sous son propre poids. Le relevé par la prise d'une photographie pour chaque ratio a été réalisé après 3 minutes, 1 heure et 24 heures après une incubation à 37 °C.

2.3.2. Étude rhéologique

Les analyses rhéologiques ont été réalisées sur les hydrogels pour étudier leur propriétés viscolélastiques, et évaluer les interactions entre le CHT et le PCD, pour les différents ratios. La gélification est mesurée par le module de conservation (G') et le module de perte (G'') avec un rhéomètre Anton Paar MCr301 (France) équipé d'un dispositif Peletier pour contrôler la température et d'une géométrie de plateaux parallèles plan-plan de 25 mm de diamètre (PP25, Anton Paar, France) pour appliquer la contrainte de cisaillement. L'expérience a été faite sur $n=3$ échantillons. Le Tableau 9 résume l'ensemble des paramètres qui ont été utilisés pour cette expérimentation.

Tableau 9 : Paramètres du rhéomètre pour évaluer les propriétés rhéologiques des hydrogels de CHT:PCD

Mode de travail	Oscillation
Mobile	PP25
Fréquence de cisaillement	1,308 min/s
Contrainte de cisaillement	327,04 Pa/mNm
Amplitude (γ)	1 %
Fréquence angulaire (ω)	10 rad.s ⁻¹
Entrefer	1 mm
Température	37 °C

Avant toutes les analyses, la région viscoélastique (RVE) des hydrogels a été déterminée par un balayage d'amplitude (entre 0 et 100 %) à une fréquence constante de 1 Hz. Les modules G' et G'' des hydrogels de chaque ratio sont ensuite évalués en fonction du temps à température fixe (37 °C) dans le mode oscillatoire. Pour être dans la RVE nous avons choisi de travailler à une fréquence 1 Hz et une amplitude de 1 %. Pour éviter que les échantillons ne sèchent pendant l'essai, un récipient d'eau a été disposé autour de l'hydrogel.

2.4. Caractérisation des éponges

2.4.1. Étude de la microstructure par MEB (Microscopie Électronique à Balayage)

La morphologie des éponges (\varnothing 11 mm, 5 mm d'épaisseur) a été observée à l'aide d'un microscope à balayage (S-4700, Hitachi, Allemagne). La tension d'accélération a été établie à 5 kV, le grossissement à 50 et le courant d'émission à 10 μ A. Les échantillons sont revêtus d'une couche de chrome par un métalliseur (682 PECS, ADL, USA) avant les observations. Du fait de la forme hétérogène des pores, une analyse de la taille a été réalisée par mesure du diamètre sur 20 pores sélectionnés aléatoirement à l'aide du logiciel ImageJ.

2.4.2. Étude de la dégradation

La dégradation des éponges a été évaluée après 7 jours dans du PBS pH 7,4 (phosphate buffer sodium) (Sigma Aldrich, France) et du PBS pH 7,4 enrichi en lysozyme (0,5 mg/mL) (Fluka Sigma Aldrich, Belgique) et contenant 0,5 mg/mL d'azide de sodium (Sigma Aldrich, Allemagne) pour éviter toute contamination du milieu. Le lysozyme est une enzyme retrouvée chez les vertébrés, impliquée dans les mécanismes de défense contre les infections bactériennes (146)(148). C'est aussi l'enzyme principalement responsable de la dégradation du CHT (140)(146)(147). Les éponges sont découpées en cylindres (\varnothing 6 mm, 5 mm de hauteur) et préalablement pesées puis immergées dans 5 mL d'une solution de PBS à 37 °C et placée à 80 rpm dans un agitateur incubateur de paillasse (Innova 40, New Brunswick Scientific, France). Les échantillons sont collectés à 2, 6, 24, 48 h, 5 et 7 jours puis rincés à l'eau ultrapure, congelés (12 h à -20 °C), lyophilisés (0,06 mBar, - 53 °C) pendant 24 h et pesés. Le taux de dégradation est déterminé par la perte de masse exprimée par la formule : $100 - \left(\frac{m_t - m_0}{m_0} * 100 \right)$ (m_t : masse après dégradation à un instant « t »; m_0 : masse de l'éponge sèche à t_0) (266). Le milieu de dégradation est changé tous les 2 jours (266). L'expérience a été réalisée en triplicata. L'ensemble des étapes est schématisé sur la Figure 27.

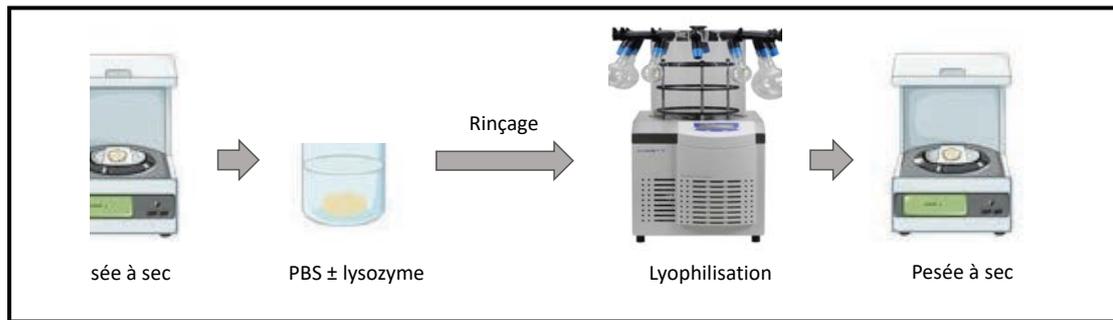


Figure 27 : Protocole pour l'étude de la dégradation des éponges dans le PBS avec ou sans lysozyme

2.4.3. Étude du gonflement

Dans un premier temps, les éponges ($\varnothing 11$ mm, 5 mm d'épaisseur) sont pesées sèches, puis hydratées dans une solution de PBS pH 7,4 avec un rapport de bain de 10 mL pour 20 mg d'éponge, à 37 °C et sous agitation (80 rpm). A intervalle de temps régulier (30 minutes puis toutes les heures pendant 6 h avec un dernier point à 24 h), les éponges sont collectées, séchées sur un papier absorbant, et pesées. Le taux de gonflement est exprimé par la formule : $\frac{m_t - m_0}{m_0} * 100$, où m_t est la masse de l'éponge humide à un temps donné « t », et m_0 la masse sèche initiale de l'éponge avant gonflement (61). La mesure du gonflement a été réalisée à température ambiante, en triplicata. L'ensemble des étapes est schématisé sur la Figure 28.

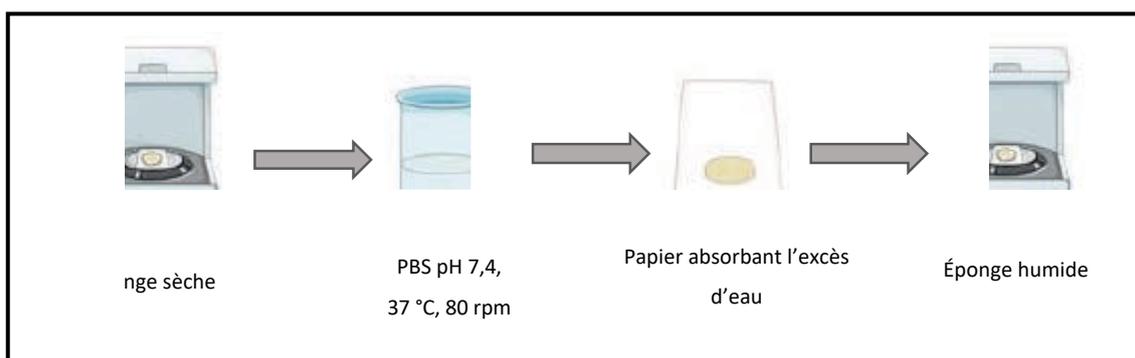


Figure 28 : Protocole pour l'étude du gonflement des éponges CHT:PCD

2.4.4. Essais mécaniques

L'évaluation de la résistance mécanique à la compression des éponges a été réalisée à l'aide d'un appareil d'essai (CellScale Univert, Canada) (Figure 29). Les éponges (en triplicata) (\varnothing 11 mm, 11 mm d'épaisseur) sont compressées à 50 % de leur taille après une hydratation dans du PBS pH 7,4 (10 mL/20 mg) pendant 4 h à 37 °C et sous agitation (80 rpm). La force de compression a été mesurée avec une cellule d'une sensibilité de 10 N. Le module élastique de compression (E) a été calculé à partir de la région linéaire de la courbe de contrainte de déformation. Nous avons également évalué le retour à la forme initiale après une décompression de 100 %.

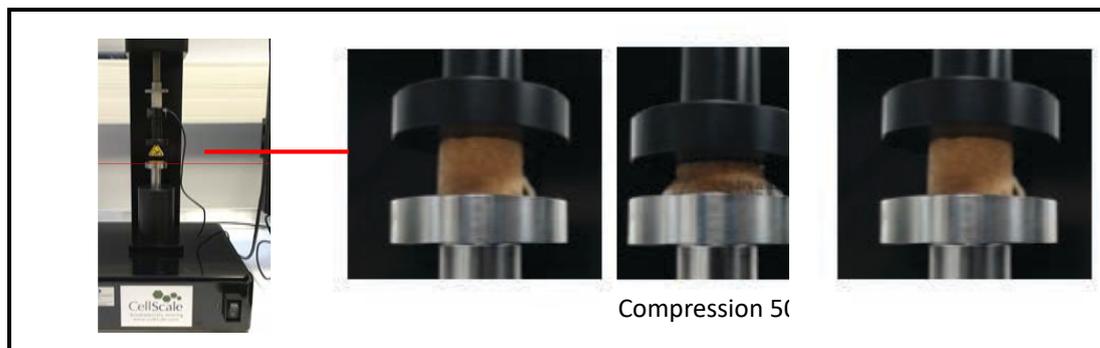


Figure 29 : Test de compression (50 %) réalisé à l'aide d'un appareil CellScale : photos de gauche à droite : éponge dans sa forme initiale, compression, retour à la forme d'origine

2.5. Étude des cinétiques d'absorption et de libération des éponges imprégnées

2.5.1. Cinétique d'absorption

Les éponges (\varnothing 11 mm, 5 mm de hauteur) sont imprégnées (à l'abri de la lumière, 37 °C, 80 rpm) dans 10 mL de CIP (2 g/L) pendant 15, 30 min, 1, 2, 4 et 24 h ou dans 10 mL de RFP (12 g/L) pendant 15, 30 min, 1, 2, 4, 24 et 72 h puis rincées à l'eau ultrapure (10 mL, 10 sec, 240 rpm) pour retirer l'excès d'ATB non fixé. Elles sont ensuite déposées dans un pot contenant 10 mL de PBS à 37 °C et 80 rpm pour l'extraction de l'ATB pendant 24 h. La quantité de principe actif absorbé et libéré par l'éponge dans le PBS est mesurée par un

spectrophotomètre UV (Shimadzu UV-1800, Thermo Fisher, France) aux longueurs d'ondes de 470 et de 333 nm respectivement pour la CIP et la RFP. L'étude a été réalisée en triplicata.

2.5.2. Libération en condition dynamique

Les éponges (\varnothing 11 mm, 5 mm de hauteur) sont imprégnées (à l'abri de la lumière, 37 °C, 80 rpm) dans une solution de CIP à la concentration fixe de 2 g/L ou de RFP dont on a fait varier la concentration (Tableau 10) pendant 4 h. Un rinçage à l'eau ultrapure (10 mL, 10 sec, 240 rpm), est réalisé après chaque imprégnation pour retirer l'excès d'ATB non fixé. N=6 échantillons ont été utilisés pour les éponges de CIP et n=3 pour les éponges de RFP

Tableau 10 : Concentrations et volumes d'eau ultrapure pour la reconstitution des solutions d'imprégnation des éponges RFP

Concentrations RFP	Volume d'eau nécessaire à la reconstitution
60 g/L	10 mL
12 g/L	50 mL
6 g/L	100 mL

L'analyse de la cinétique de libération des ATBs a été effectuée en mode dynamique (SOTAX CE7 Smart de type USP IV) couplé à un spectrophotomètre UV (UV/VIS Spectrophotometer lambda 25 Perkin Elmer, Japon) (Figure 30). Le débit appliqué a été fixé à 5 mL/min pour se rapprocher au plus près des conditions *in vivo* de faible circulation dans l'os. Un volume de PBS (pH 7,4) de 200 mL a été utilisé par éponge. L'analyse par spectrophotométrie UV a été réalisée à 270 nm pour la CIP et 333 nm pour la RFP. L'étude a été conduite sur n=6 échantillons.

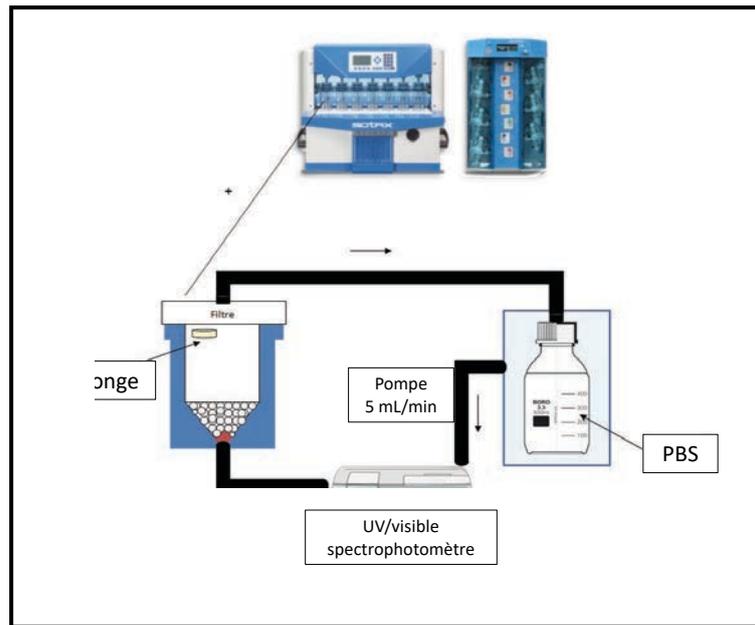


Figure 30 : Schéma de l'appareil de dissolution en flux continu Sotax

2.6. Tests biologiques

2.6.1. Étude de la cytotoxicité – méthode de l'extrait (contact indirect)

La cytotoxicité des éponges a été évaluée par la méthode d'extrait par contact indirect selon la norme ISO 10993-5 (Figure 31) sur des cellules préostéoblastiques MC3T3-E1 (CRL-2594™, ATCC®, USA). Les cellules sont cultivées dans du milieu de culture MEM- α Gibco® (Thermo Fisher Scientific, France) enrichi en Sérum de Veau Fœtal (SVF, 10 %, Eurobio, France) dans un incubateur CB150/APT Line/Binder (Lab Exchange, France) à 37 °C, sous une atmosphère à 5% de CO₂ et une humidité relative de 100 %. Les éponges sont préalablement réhydratées dans le milieu de culture (MEM- α) en respectant le ratio 2 mg d'éponge pour 1 mL de milieu à 37°C sous agitation (80 rpm) pendant 2 heures. Elles sont ensuite retirées, pesées immédiatement après l'élimination de l'excès de milieu à l'aide d'un papier absorbant, puis incubées à nouveau pendant 24 h dans le MEM- α (100 mg d'éponge/1 mL de milieu) pour réaliser le test de l'extrait. En parallèle, les cellules MC3T3-E1 sontensemencées sur une plaque polystyrène de culture cellulaire (TCPS) 96 puits (Falcon®, France) à raison de 4×10^3 cellules/puit. Au bout de 24 heures, le milieu de culture des cellules est remplacé par le milieu

d'extraction filtré (filtre seringue stérile de 0,2 μm Acrodisc[®], Pall corporation, France) et incubé 24 h (37 °C, CO₂ 5 %, HR 100%).

La viabilité cellulaire est déterminée par le test AlamarBlue[®] (Uptima, Interchim, France). L'AlamarBlue[®] est un indicateur redox qui change de couleur et devient fluorescent lors de la réduction chimique du milieu de culture en cas d'activité métabolique des cellules. Ce test est basé sur la mesure du taux d'oxydation de ce colorant (267). Cette réponse est proportionnelle à l'activité métabolique cellulaire.

Après la dernière incubation (24h), le milieu est substitué par 200 μL d'une solution de milieu de culture contenant 10 % d'AlamarBlue[®]. La plaque est incubée et protégée de la lumière pendant 2 h à 37 °C (5 % de CO₂, 100%HR). 150 μL /puit sont transférés dans une plaque 96 puits Fluoro-LumiNunc[™] (ThermoScientific, France). La fluorescence est mesurée par un fluoromètre (Twinkle LB 970 Microplate Fluorometer, Berthold Technologies GmbH & Co, Germany) à 530 nm pour la longueur d'onde d'excitation, et 590 nm pour la longueur d'onde d'émission. L'activité métabolique cellulaire est exprimée par le pourcentage d'intensité de la fluorescence des échantillons par rapport au témoin (milieu de culture n'ayant pas été en contact avec l'échantillon). 6 expériences séparées ont été menées par échantillons (\varnothing 11 mm, hauteur 5 mm), chaque expérience a été réalisée en triplicata.

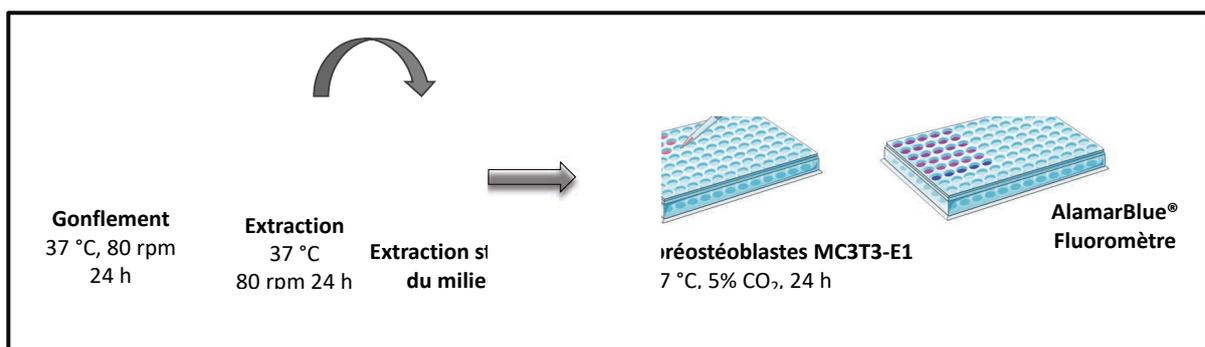


Figure 31 : Protocole schématisé du test d'extraction pour évaluer la cytotoxicité

2.6.2. Évaluation de l'activité antibactérienne

2.6.2.1. Test de diffusion (Kirby Bauer)

Une libération statique a été réalisée au préalable avant d'effectuer le test de diffusion. Les éponges sont imprégnées (\varnothing 11 mm, 5 mm de hauteur) à l'abri de la lumière dans une solution de CIP (2 g/L) ou de RFP (12 g/L ou 60 g/L) ou de CIP-RFP (constituée de RFP (concentration finale 12g/L) reconstituée avec 50 mL de CIP 2g/L (protocole d'imprégnation Figure 32) pendant 4 h (37 °C, 80 rpm) après stérilisation aux UV (15 min). Elles sont ensuite rincées dans l'eau ultrapure (10 mL, 10 sec, 240 rpm) et déposées dans un pot contenant 10 mL de PBS stérile pH 7,4. Toutes les 6 h puis à 24, 72 et 96 h, 1 ml de milieu est prélevé et entièrement renouvelé. La libération a été faite à 37 °C, sous une agitation de 80 rpm, dans un environnement stérile (poste de sécurité microbiologique Bioadvance, France). N=6 échantillons sont utilisés.

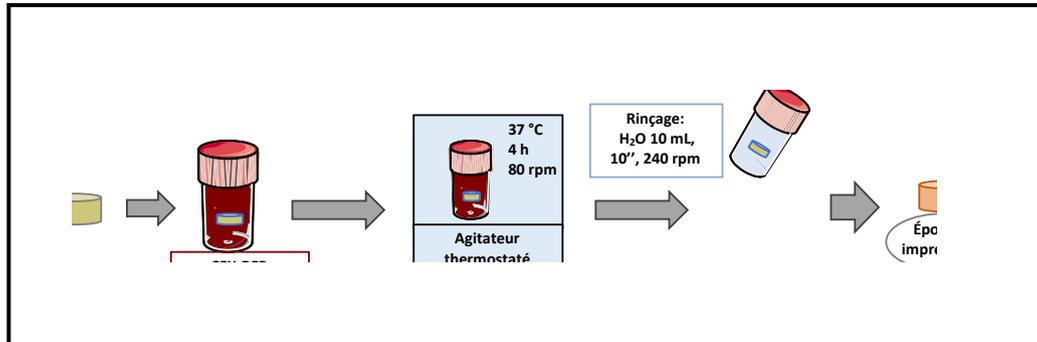
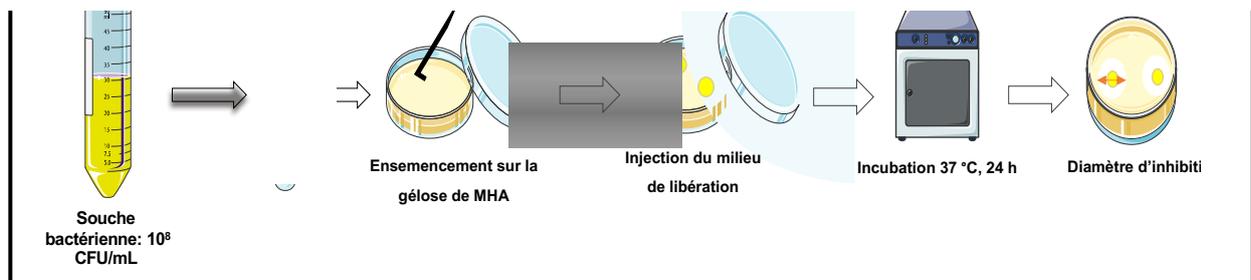


Figure 32 : Étapes du protocole d'imprégnation des éponges CIP-RFP à partir d'une solution constituée de 600 mg de RFP reconstituée avec 50 mL de CIP d'une poche pour usage hospitalier (concentration finale : CIP 2g/L, RFP 12 g/L)

Le test de diffusion est effectué avec 0,1 mL (10^4 CUF/mL) d'un inoculum d'*Escherichia coli* K12 ou de *Staphylococcus aureus* 08238 ensemencé sur une gélose de MHA (Mueller Hinton Agar) (18 mL) (mélange de Mueller Hinton (ThermoScientific®, Oxoid Microbiological Products, France), d'Agar (Difco®, Fisher Scientific™, France) et d'eau ultrapure (pH final 7,2). 50 μ L du milieu de libération effectuée en condition statique sont ensuite injectés dans des puits créés à équidistance sur la plaque de Pétri contenant la gélose. Les diamètres d'inhibition

sont mesurés après une incubation de 24 h à 37 °C. La méthode est schématisée Figure 33. L'expérience a été menée sur 6 échantillons pour les éponges CIP et 3 échantillons pour les éponges RFP.



2.6.2.2. Cinétique de la réduction bactérienne (Kill Time)

a) Dénombrement des bactéries dans l'inoculum initial :

10 mL de RC (Ringer Cystéine), constitué d'un mélange de Ringer Tablet (Merck Millipore, France), de L-cystéine hydrochlorhydrate (Fisher Scientific, Acros Organics, Belgique) et d'eau ultrapure (pH final 6,9) sont ajoutés aux souches d'*Escherichia coli* K12 et de *Staphylococcus aureus* 08238. 1 mL de cette suspension bactérienne est prélevé et ajouté à 9 mL de RC (dilution 10^{-1}). Des dilutions de 10^{-2} à 10^{-7} sont ensuite réalisées et 0,1 mL de chacune de ces suspensions est ensemencé sur une gélose de MHA. Après 24 h à 37 °C les colonies qui ont poussé sont dénombrées. La gélose contenant 15 à 150 colonies est celle de référence pour la détermination de l'inoculum initial. L'inoculum en UFC/mL est calculé par la formule $N = n * 10 * 10^{ldl}$ (n : nombre de colonies, et ldl : taux de dilution de la gélose de référence).

b) Dénombrement des bactéries après incubation des éponges imprégnées d'antibiotiques :

200 µl de la dilution 10^{-1} sont déposés sur les éponges imprégnées d'ATBs (CIP : 2 g/L, RFP : 12 g/L pendant 4 h) et re-lyophilisés. Ils sont ensuite incubés 30 min, 2, 4, 6, 24 et 48 h. Les éponges sont alors déposées dans 2 mL de PBS, passées aux ultrasons (1 min) et au vortex (30 sec). Des dilutions successives de 10^{-1} à 10^{-4} sont ensuite réalisées dans une solution de RC (9 mL), et 0,1 mL des suspensions bactériennes obtenues est ensemencé sur des géloses de MHA. Les colonies formées sont dénombrées après incubation de 24 h à 37 °C. Nous avons travaillé avec des éponges de 6 mm de diamètre et 5 mm de hauteur, N=3 échantillons et une éponge témoin par ratio (6 mm de diamètre et 5 mm d'épaisseur). L'ensemble des différentes étapes est résumé Figure 34.

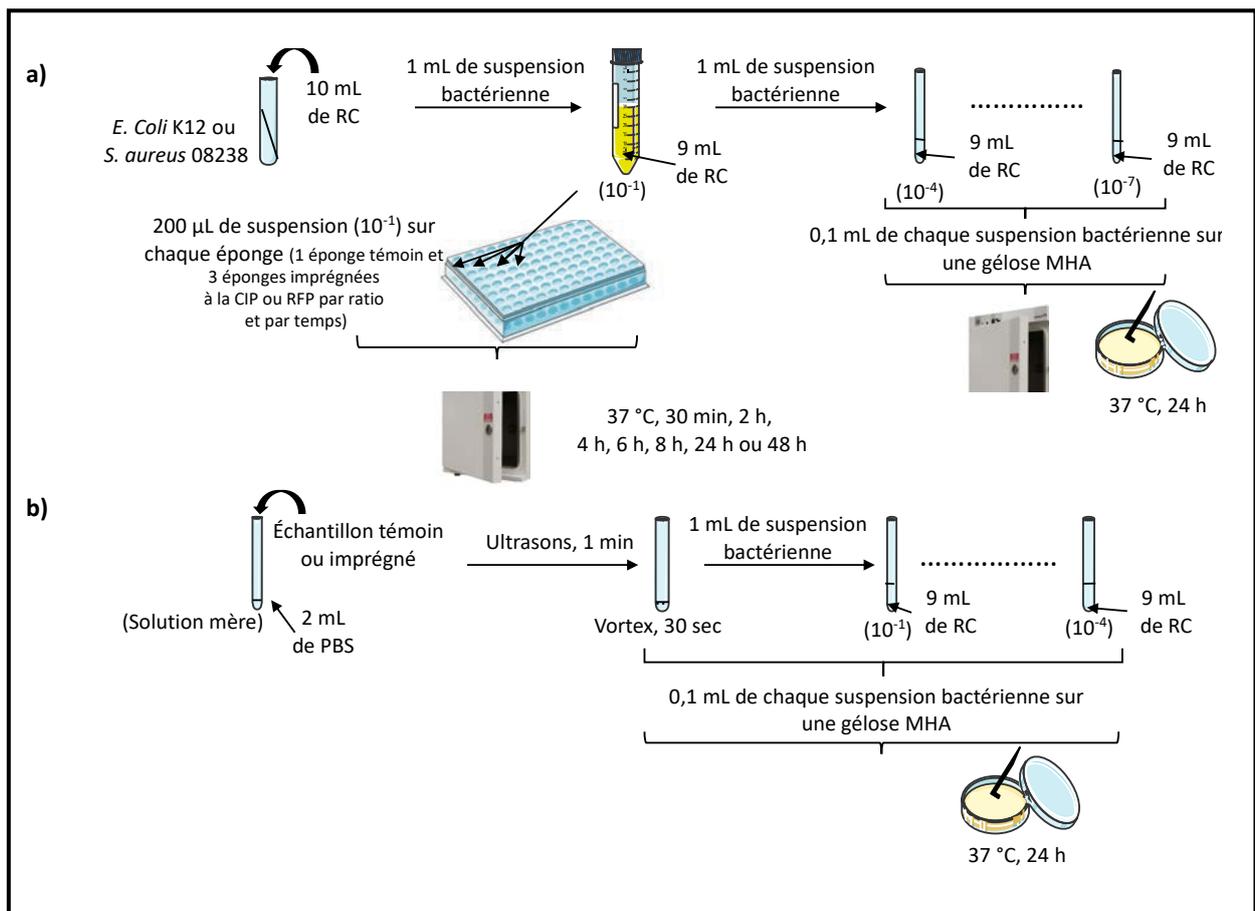


Figure 34 : Protocole des étapes du test de Kill Time pour les éponges de CHT:PCD sur *S. aureus* et *E. coli*

2.6.2.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la ciprofloxacine et de la rifampicine

À partir des solutions mères d'ATBs (CIP : 2 g/L et RFP : 12 g/L) sont réalisées des dilutions successives à des concentrations de 64 mg/L à 31,25 µg/L. En parallèle est préparé un inoculum bactérien d'*Escherichia coli* K12 ou de *Staphylococcus aureus* 08238 à 10⁵ UFC/mL. Dans une microplaque (CytoOne®) sont déposés, 180 µL de milieu Mueller-Hinton, 10 µL de la suspension bactérienne et 10 µL des dilutions d'ATBs. Des témoins négatif et positif sont réalisés pour vérifier la non-contamination du milieu et la croissance bactérienne en l'absence d'ATB. Après incubation à 37 °C pendant 24 h, la CMI, caractéristique de l'effet bactériostatique de l'ATB, correspond à la plus petite concentration pour laquelle aucune turbidité n'est observée. La solution correspondant à la CMI et celles pour lesquelles aucune turbidité n'est visible sont ensuite ensemencées sur une gélose MHA et incubées à 37 OC pendant 24 h. L'ensemble du protocole est schématisé et synthétisé Figure 35.

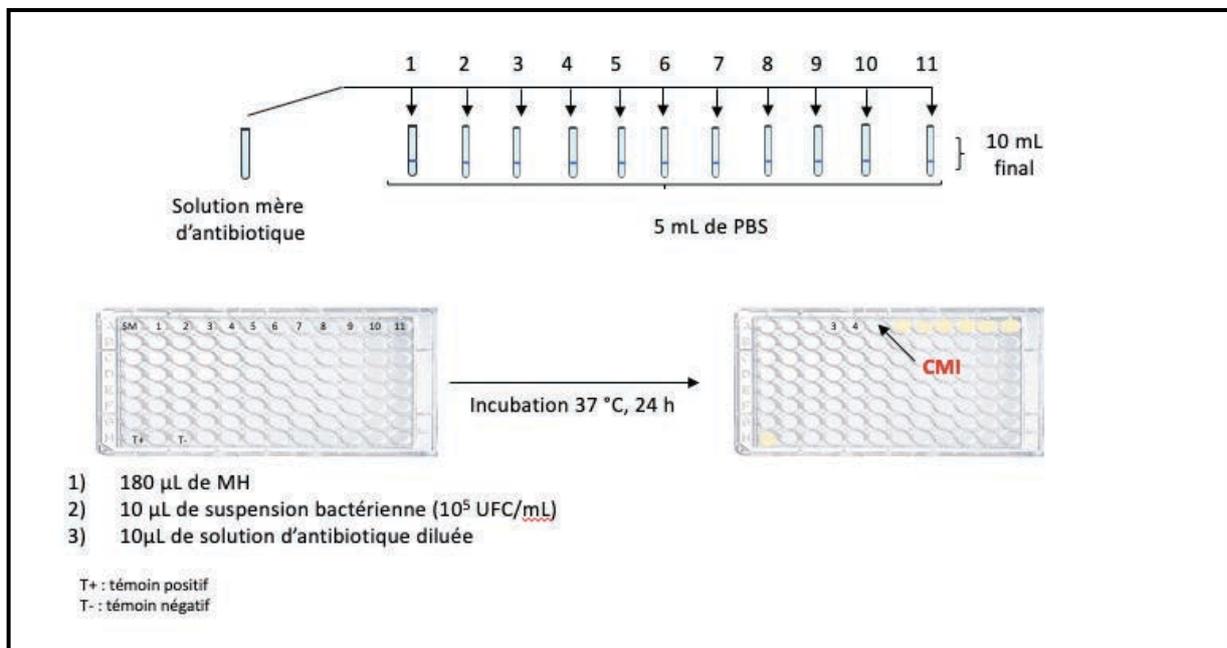


Figure 35 : Protocole de détermination de la CMI et de la CMB à partir de dilutions d'une solution mère d'antibiotique (CIP : 2 g/L et RFP 12 g/L) sur *S. aureus* et *E. coli*

2.7. Analyses statistiques

Toutes les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart type. Les tests statistiques ont été réalisés par un logiciel Statplus (version Build 6 .7.1.0/Core v6.2.02). Les données ont été comparées par un test de t-Student, une analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) et un test de Tukey pour évaluer les différences significatives (considérées comme significativement différentes si p-value < 0,05).

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

Partie 1 : Conception et caractérisation des éponges

1. Préparation et caractérisation des hydrogels

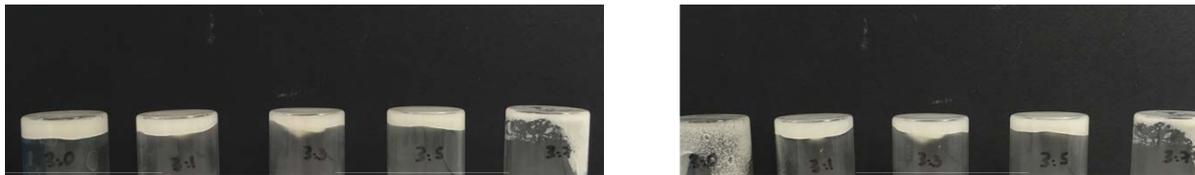
Dans le cadre de ces travaux, nous allons élaborer des éponges (issues de la lyophilisation d'hydrogels) qui seront imprégnées dans des solutions d'antibiotiques pour le traitement de l'infection du pied diabétique. Les hydrogels de CHT:PCD ont été élaborés au cours d'un précédent travail de thèse. Le Dr. Flores a pu déterminer au cours de ses travaux certains paramètres nécessaires à la formation de ces hydrogels comme la concentration en CHT (3 %_{w/v}), la granulométrie des poudres (< 125 µm), le co-broyage à sec des poudres des polymères de CHT et CDs, et les étapes de la préparation (suspension des poudres dans l'eau puis acidification). La méthode de formation des hydrogels au vortex a été remplacée par le système de deux seringues connectées comme schématisé sur la Figure 26. Cette méthode permet d'obtenir des hydrogels plus homogènes. Dans le cadre de cette thèse, l'impact des ratios CHT:PCD (3:0, 3:1, 3:3 et 3:7) ainsi que l'effet d'un traitement thermique seront évalués afin que l'éponge réponde au cahier des charges en termes de viscoélasticité, de gonflement, de résistance mécanique, de dégradation et de cytocompatibilité. Ces propriétés sont indispensables à notre application pour le traitement d'une plaie infectée du pied diabétique.

1.1. Observation macroscopique des hydrogels

Lors de la préparation des hydrogels, la formation d'une solution visqueuse homogène pour tous les ratios est observée à l'exception du ratio 3:7 qui reste liquide avec une séparation de phase poudre/solvant.

Pour observer la formation d'un gel compact, les hydrogels ont été préparés dans les seringues interconnectées puis injectées dans un flacon. Le test est réalisé en retournant le flacon et en observant si l'hydrogel s'écoule ou reste au fond du flacon (265). Comme le montre la Figure 36 A, la formulation 3:7 s'écoule sous l'effet de la gravité juste après injection

et inversion du flacon. Après 1 h à 37°C, le ratio 3:0 commence également à s'écouler (Figure 36 B). En revanche, les ratio 3:1, 3:3 et 3:5 ne montrent pas de signes d'écoulement pendant l'expérience, même après 24 h. Une étude rhéologique permettra d'approfondir ce test visuel. Au regard de ces observations macroscopiques et de la formation d'une suspension lors de la préparation, la formulation 3:7 est abandonnée. En revanche, nous avons décidé de continuer à travailler avec la formulation 3:0 comme contrôle.



0, 3:1, 3:3, 3:5 et 3:7 juste après injection (A), après 1 h (B) et

24 h (C) à 37 °C

1.2. Analyse rhéologique

L'analyse rhéologique a été réalisée afin de caractériser les hydrogels et de connaître leurs propriétés viscoélastiques. Les hydrogels 3:0, 3:1, 3:3 et 3:5 sont préparés et immédiatement injectés sur le dispositif Peletier du rhéomètre pour être analysés. L'évolution des modules G' (module élastique) et G'' (module de perte) des hydrogels a été mesurée à 37 °C, en fonction du temps et en mode oscillatoire avec une amplitude de déformation de 1 % (Figure 37).

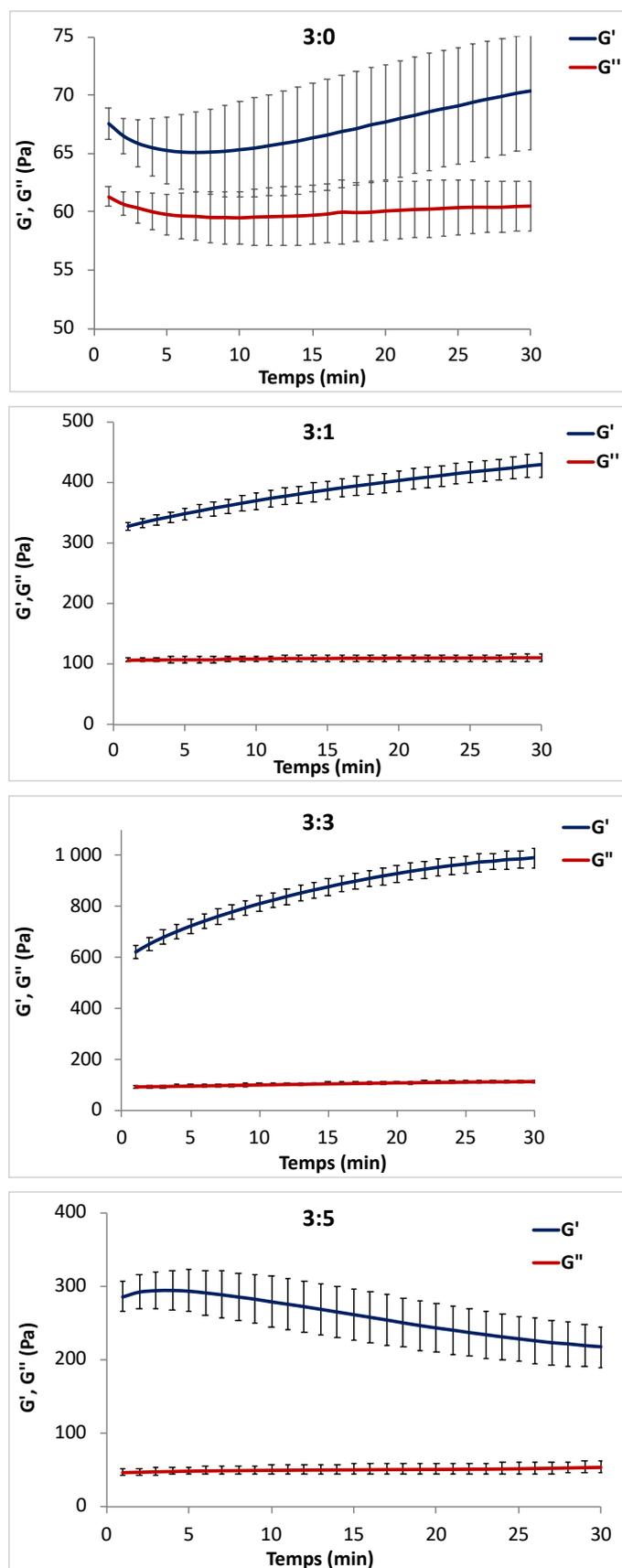


Figure 37 : Évolution des modules élastiques G' et de perte des hydrogels 3:0, 3:1, 3:3, 3:5 et 3:7 ($\gamma=1\%$, $\omega=10\text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$, 1 mm , $37\text{ }^\circ\text{C}$). $N=3$ échantillons

Quelle que soit la formulation, le module élastique G' est supérieur au module de perte G'' dès le début de l'expérience. Ceci signifie que l'hydrogel se comporte comme un solide viscoélastique qui est formé instantanément dans la seringue (hydrogel préformé) lors de l'acidification de la suspension (Figure 26). L'ajout d'acide acétique provoque la protonation des groupes amines en groupements ammoniums et par conséquent le déploiement des chaînes macromoléculaires du CHT par répulsion des charges positives. Par ailleurs, cette solubilisation facilite les interactions ioniques entre les groupes NH_3^+ du CHT et les groupes COO^- du PCD soluble pour former un complexe de polyélectrolytes (PEC) (268)(269). Les Drs Flores et Palomino-Durand ont observé ce même phénomène au cours de leurs travaux de thèses (109)(110). Anraku et *al.* ont aussi démontré la formation d'interactions ioniques lors de la préparation d'un hydrogel du CHT avec de la sulfobutyl-éther- β CD. L'analyse des données rhéologiques a montré la formation d'un hydrogel élastique avec des valeurs de module élastique G' de l'ordre de 5000 Pa et de module de perte G'' de 500 Pa (270). Dans notre cas, des profils des modules élastiques différents sont observés en fonction de la formulation. L'augmentation de G' pour les ratios 3:1 et 3:3 peut être due aux interactions qui continuent de se former entre les deux polymères. Ainsi, l'équilibre viscoélastique n'est pas encore atteint. En revanche, pour les ratios 3:0 et 3:5 aucune différence significative n'est observée quant à l'évolution des valeurs du module élastique au cours du temps ($p > 0,05$).

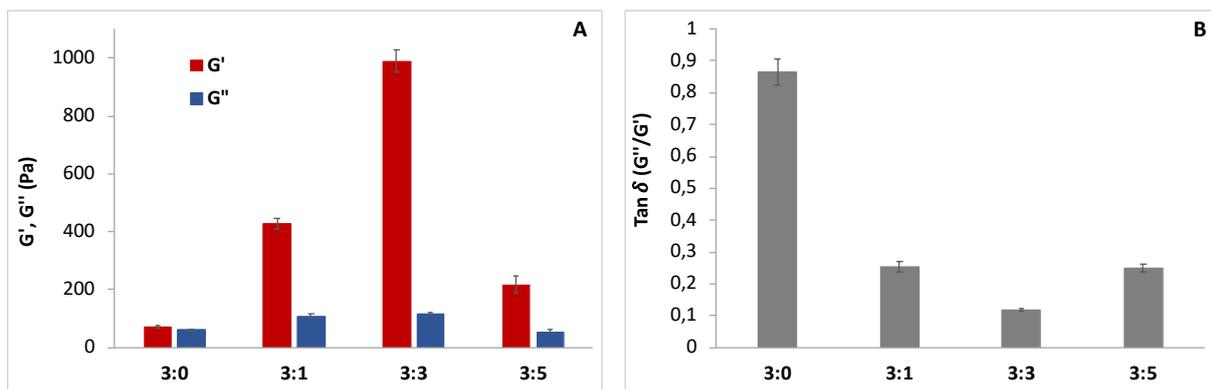


Figure 38 : (A) Évolution des valeurs mesurées à t 30min de G' et G'' (A) et de la tangente δ (B) selon les ratios 3:0, 3:1, 3:3 et 3:5 ($\gamma=1\%$, $\omega=10 \text{ rad.s}^{-1}$, 1 mm, 37 °C)

Tableau 11 : Valeurs de G' , G'' , de leur erreur relative (ER) et de $\tan \delta (G''/G')$ à 30 min sous condition $\gamma=1\%$ et $\omega=10 \text{ rad.s}^{-1}$ et quantité de groupements amines et de groupements carboxylates pour les hydrogels de CHT:PCD

CHT:PCD	G' (Pa)	ER de G' (%)	G'' (Pa)	ER de G'' (%)	$\tan \delta$	NH_3^+ (mmol)	COO^- (mmol)
3:0	70 ± 5	8	61 ± 2	3	$0,9 \pm 0,04$	2,25	0
3:1	428 ± 19	4,5	109 ± 20	6	$0,3 \pm 0,02$	2,25	0,6
3:3	990 ± 37	3,7	115 ± 34	4	0,12	2,25	1,8
3:5	217 ± 27	13	54 ± 8	15	$0,25 \pm 0,01$	2,25	3

Les valeurs des modules élastique (G') et de perte (G'') relevées juste après l'injection de l'hydrogel montrent une augmentation de G' avec l'ajout de PCD dans la formulation jusqu'au ratio 3:3 puis une diminution de cette valeur est observée lorsque la quantité de PCD est en excès (ratio 3:5) (Figure 38 A et Tableau 11). On observe la même tendance pour le module G'' . Il est important de noter que les valeurs des erreurs relatives (ER) calculées à partir des données obtenues à 30 min pour les modules G' et G'' montrent une bonne reproductibilité des échantillons entre eux (Tableau 11).

Pour déterminer l'équilibre viscoélastique des hydrogels, il est nécessaire d'évaluer la valeur de $\tan \delta = G''/G'$ appelée facteur de perte (95). Plus ce rapport est faible, plus les propriétés élastiques de l'hydrogel sont fortes (271)(272). Ainsi, une diminution de la valeur de $\tan \delta$ avec l'augmentation de la quantité de PCD dans la préparation est observée (Figure 38 B et Tableau 11). Un hydrogel physique est caractérisé par une valeur de $\tan \delta$ supérieure à 0,1 : c'est un hydrogel dit « faible » pour un rapport G''/G' élevé et « fort » pour un rapport G''/G' faible (95)(273). La formulation 3:0 forme donc l'hydrogel le plus faible car celui-ci possède la valeur de $\tan \delta$ la plus élevée. L'augmentation de la proportion de PCD dans la formulation entraîne la formation d'hydrogels plus forts car il se crée des interactions ioniques entre les deux polymères formant un PEC. Au sein du laboratoire, la teneur en groupements amines du CHT et celle en groupements carboxyliques du PCD ont été déterminées. Elles sont respectivement de 5 mmol/g de CHT et 4 mmol/g de PCD (199)(254). Ainsi, le ratio CHT:PCD 3:3 montre l'équilibre des charges positives et négatives le plus optimal, générant la plus forte densité d'interactions électrostatiques, et entraînant donc le module de conservation (G') le plus élevée et la $\tan \delta$ la plus faible (Tableau 11).

2. Caractérisation des éponges

2.1. Observations macroscopiques des éponges

Après injection dans un moule (tube Falcon, \varnothing 11 mm, 15 mL), les hydrogels sont congelés puis lyophilisés pour obtenir des éponges. Des cylindres de 11 mm de diamètre sont ensuite découpés par tranche de 5 mm dans la longueur de l'éponge obtenue à partir du tube Falcon. Macroscopiquement, leur couleur est blanche (Figure 39 NTT) et leur porosité semble régulière. Le traitement thermique (TT) à 140 °C entraîne une coloration brune. Il est à l'origine d'un réarrangement des chaînes de CHT et de la formation de liaisons covalentes (réticulation) (274). Des liaisons amides se forment à haute température entre les groupes NH_2 du CHT et les groupes COOH du PCD. Péniche et *al.* ont montré la formation de liaisons amides entre le CHT et du polyméthacrylate d'acide salicylique après un traitement thermique à 120 °C (275). Cette réaction a aussi été décrite par Banarbé et *al.* lorsqu'un traitement de 120 °C était appliqué sur des films de CHT et de pectine (276). Il est également possible qu'une réaction d'estérification se produise entre les groupements OH du CHT et les groupements COOH du PCD.

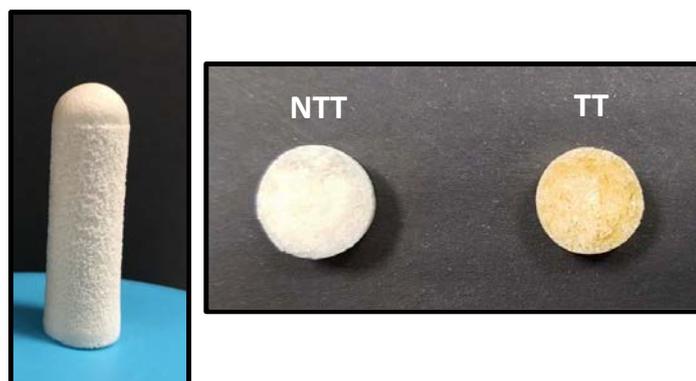


Figure 39 : Photo d'un cylindre d'éponge de CHT:PCD obtenue après lyophilisation dans son moule de 11 mm de diamètre et 40 mm de hauteur et éponges découpée avant (NTT) et après traitement thermique (TT)

La réticulation thermique des éponges a également été étudiée au laboratoire par le Dr Palomino-Durand au cours de sa thèse. Les résultats de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRFT) des éponges 3:3 traités thermiquement à 160 °C ont révélé un

spectre présentant une intensité diminuée du pic à 1569 cm^{-1} comparé aux éponges non traitées, suggérant la formation de liaisons amides par consommation des groupes amines (109). Cette réaction de réticulation a aussi été mise en évidence au laboratoire après un traitement thermique à 140 °C pendant 105 min d'un support textile fonctionnalisé par un système multicouche à base d'un PEC de CHT et de PCD par Aubert-Viard et *al.*. Ils ont montré qu'après ce traitement, le nombre de fonctions amines (déterminé par dosage à l'acide orange) diminuait de manière significative par la formation de liaisons amides entre les groupes amines du CHT et carboxyliques du PCD (277).

Après hydratation dans une solution de PBS (pH 7,4), toutes les éponges sont facilement manipulables et montrent une bonne résistance mécanique après gonflement, à l'exception des éponges 3:0 NTT qui ne présentent aucune résistance (Figure 40). Nous avons décidé de ne pas travailler avec cette formulation non traitée thermiquement qui ne répond pas au cahier des charges. Le dispositif doit en effet présenter une bonne résistance mécanique et doit rester sous la forme d'une éponge pour combler la surface des plaies.

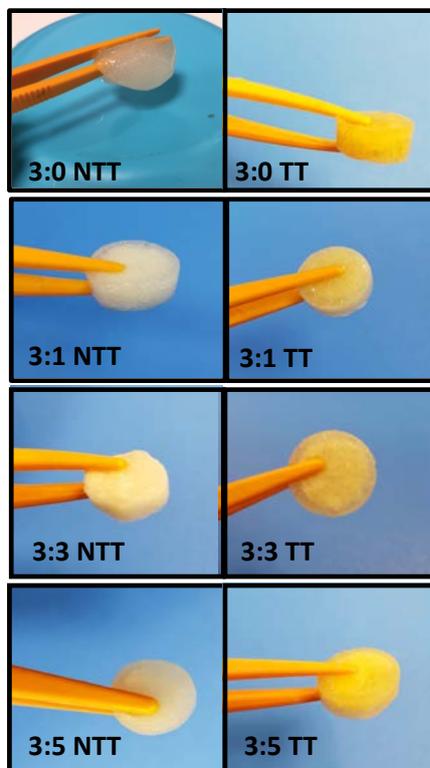


Figure 40 : Images des éponges 3:0 NTT/TT, 3:1 NTT/TT, 3:3 NTT/TT et 3:5 NTT/TT après réhydratation pendant 4 h dans une solution de PBS pH 7,4 à 37 °C et 80 rpm

2.2. Observations microscopiques de la microarchitecture des éponges

La microarchitecture des éponges a été observée par MEB (Microscopie Électronique à Balayage). Elle joue un rôle dans la capacité d'absorption des principes actifs. Plus un support est poreux, plus sa capacité d'absorption sera importante (222)(223). De plus, cette porosité facilitera les échanges avec les fluides biologiques.

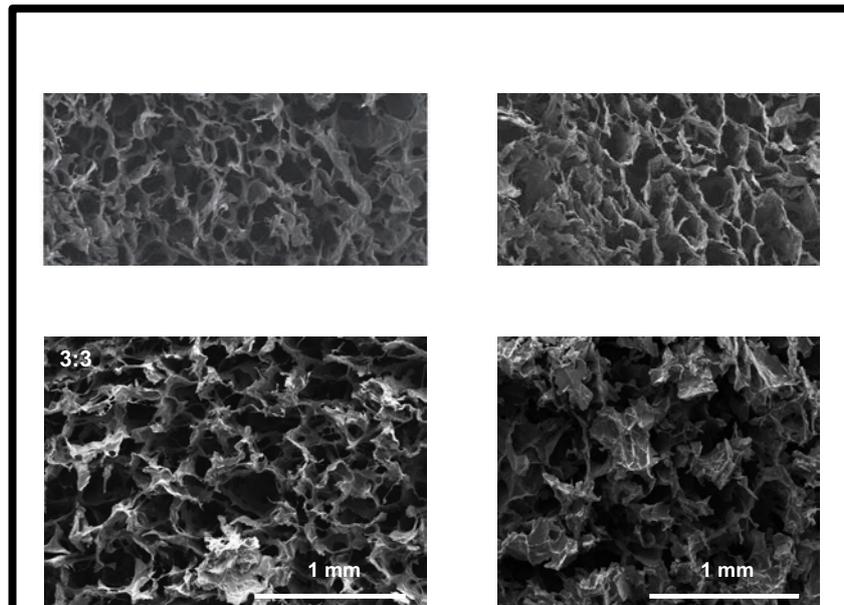


Figure 41 : Images MEB de la microarchitecture des éponges de CHT:PCD 3:0, 3:1, 3:3 et 3:5 TT (grossissement x50)

Les analyses MEB n'ont pas permis de mettre en évidence une différence de microstructure entre les éponges, qu'elles soient traitées thermiquement ou non. Seules les images des éponges réticulées sont présentées Figure 41. Une structure poreuse régulière et interconnectée est observée pour les ratios 3:0 TT, 3:1 TT et 3:3 TT. Cependant, l'augmentation de la proportion de PCD perturbe cette structuration. Le CHT est responsable de la morphologie alvéolaire et spongieuse de l'éponge. En revanche, le PCD est un polymère globulaire entraînant une irrégularité des contours des pores qui deviennent peu ou mal définis (278). Une disparition complète de cette morphologie spongieuse est constatée pour le ratio 3:5. L'analyse des diamètres des pores a révélé une grande hétérogénéité pour un même échantillon (3:0 TT : $176 \pm 50 \mu\text{m}$, 3:1 TT : $208 \pm 67 \mu\text{m}$, 3:3 TT : $177 \pm 56 \mu\text{m}$ et 3:5 TT :

165 ± 35) sans qu'aucune différence significative n'ait été mise en évidence entre les formulations ($p > 0,05$).

Une architecture hautement poreuse et interconnectée est favorable pour un dispositif médical vecteur de médicaments. Des études ont en effet démontré que les structures poreuses ont une grande capacité d'absorption (222)(223). Andersson et *al.* ont montré que la taille des pores et leur architecture influencent la libération (220). Ainsi, des supports de silices, pour la délivrance d'ibuprofène, ayant différentes tailles de pores, de connectivités et de géométries ont été comparés. Ils ont observé des quantités d'ibuprofène libérées plus importantes pour les matériaux avec les pores de grandes tailles. Les cinétiques de libération les plus rapides ont été obtenues à partir de matrices ayant des pores interconnectés et de formes sphériques.

2.3. Évaluation de la dégradation des éponges

Le changement de pansement dans le traitement des infections du pied diabétique est réalisé entre 1 et 3 jours. Dans le cadre de l'application clinique, le dispositif est donc destiné à être utilisé pour des durées de 3 jours maximum. L'évolution de sa stabilité dans le temps a été évaluée pendant 7 jours (168 h) dans une solution de PBS à 37 °C et sous agitation (80 rpm) avec (Figure 42 C et D) et sans lysozyme (Figure 42 A et B). Le lysozyme est une enzyme qui dégrade le CHT *in vivo* par coupure de ses liaisons glycosodiques (140)(146)(147). Elle est aussi impliquée dans le mécanisme de défense contre les infections bactériennes chez les vertébrés (146)(148).

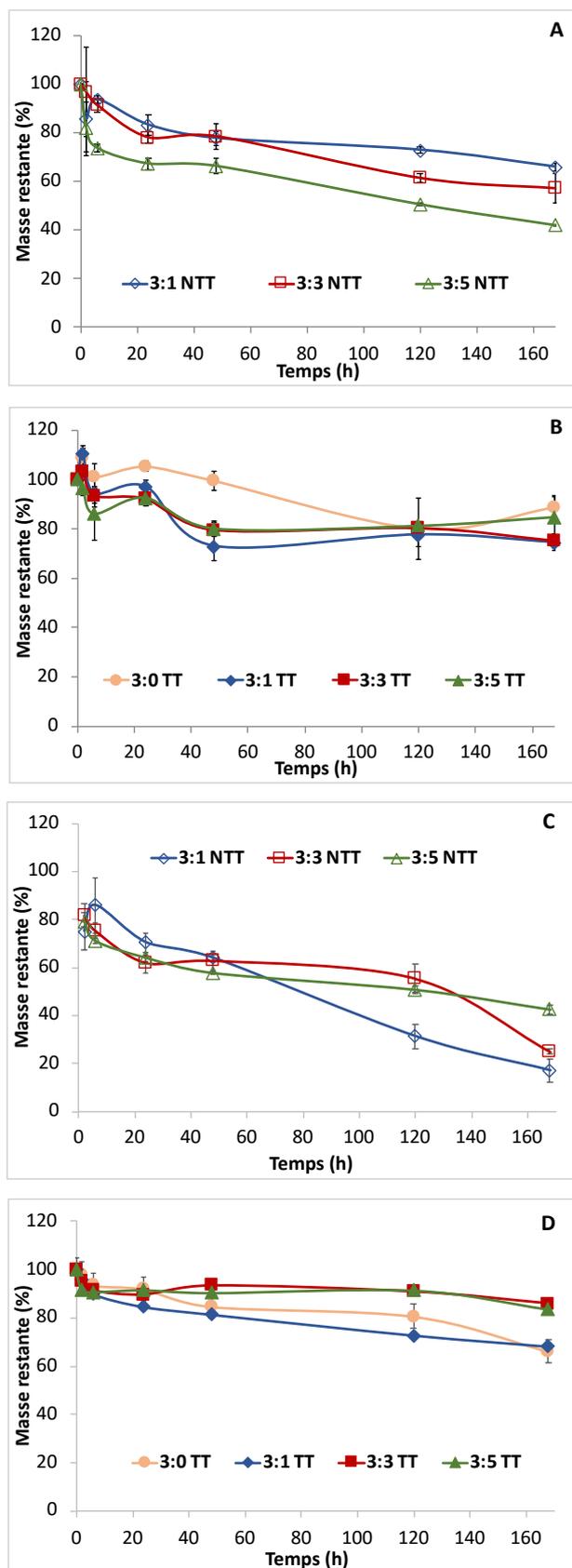


Figure 42 : Profils de dégradation des éponges CHT:PCD 3:0, 3:1, 3:3 et 3:5 NTT (A et C) et TT (B et D) dans une solution de PBS pH 7,4 (A et B) enrichie en lysozyme (C et D) à 37 °C sous 80 rpm. N=3 échantillons

Les profils de dégradation en absence de lysozyme montrent une diminution progressive de la masse (en %) des éponges au cours du temps (Figure 42 A et B). Ainsi, après 7 jours, la perte de masse relevée est de $34 \pm 2 \%$, $43 \pm 6 \%$ et $58 \pm 0 \%$, respectivement pour les éponges 3:1 NTT, 3:3 NTT et 3:5 NTT (Tableau 12). La quantité de PCD dans la formulation a une influence sur la vitesse de dégradation du système. Plus cette quantité est importante, plus la perte de masse est grande. Celle-ci est attribuable à la solubilisation du PCD dans la solution de PBS. Après traitement thermique (Figure 42 B), la dégradation des éponges est moins importante. Elle se limite à une perte de masse de 12 à 25 % sans différence significative entre les différents ratios ($p > 0,05$). Ceci s'explique par la réticulation d'une partie du PCD avec le CHT par formation de liaison amide (et ester) décrite dans le paragraphe précédent.

En présence de lysozyme, les cinétiques de dégradation sont accélérées avec une perte de masse plus importante pour les éponges n'ayant pas été soumises à un traitement thermique, s'expliquant par l'action du lysozyme sur le CHT (Figure 42 C et D). Après 7 jours, une perte de masse de $83 \pm 5 \%$, $75 \pm 1 \%$ et $58 \pm 3 \%$ est observée respectivement pour les éponges 3:1 NTT, 3:3 NTT et 3:5 NTT (Tableau 12). Inversement à ce qui a été décrit précédemment, la dégradation des éponges ralentit avec l'augmentation de la proportion de PCD dans la formulation (Tableau 12). La réticulation du réseau polymère empêche la diffusion et l'activité de l'enzyme. Il est important de noter que les éponges réticulées montrent une meilleure stabilité dans le temps que celles non-réticulées (que ce soit en présence ou en absence de lysozyme). L'effet du traitement thermique sur la stabilité des PECs à base de CHT et PCD avait déjà été mise en évidence lors de travaux antérieurs dans l'équipe. Aubert-Viard et *al.* ont montré une amélioration de la stabilité de leur système multicouche après un traitement thermique à $140 \text{ }^\circ\text{C}$ (277). Les Drs. Flores et Palomino-Durand, et l'équipe de Ji et *al.* ont également rapporté que les éponges de CHT se dégradent moins vite après réticulation thermique (110)(109)(274).

Tableau 12 : Pourcentage de perte massique en fonction du ratio CHT:PCD et du traitement thermique après 7 jours de dégradation enzymatique dans une solution de PBS (pH 7,4, 80 rpm, 37 °C)

	Sans lysozyme		Avec lysozyme	
	NTT	TT	NTT	TT
3:0		11 ± 4 %		34 ± 5 %,
3:1	34 ± 2 %	24 ± 3 %	83 ± 5 %,	32 ± 6 %,
3:3	43 ± 6 %	25 ± 3	75 ± 1 %	14 ± 1 %
3:5	58 ± 0 %	15 ± 8 %	58 ± 3 %	17 ± 5 %

2.4. Gonflement des éponges

Dans le cadre de l'application clinique, le dispositif va être appliqué dans des plaies souvent profondes. Il doit gonfler après imprégnation dans la solution d'antibiotique pour remplir la cavité et pour libérer les agents antibactériens sur toute la surface de la plaie. L'absorption et la libération des médicaments sont en partie corrélées au taux de gonflement (82)(269). Il a donc été évalué à intervalles de temps réguliers pendant 24 h dans une solution de PBS à 37 °C et sous agitation de 80 rpm comme présenté Figure 43.

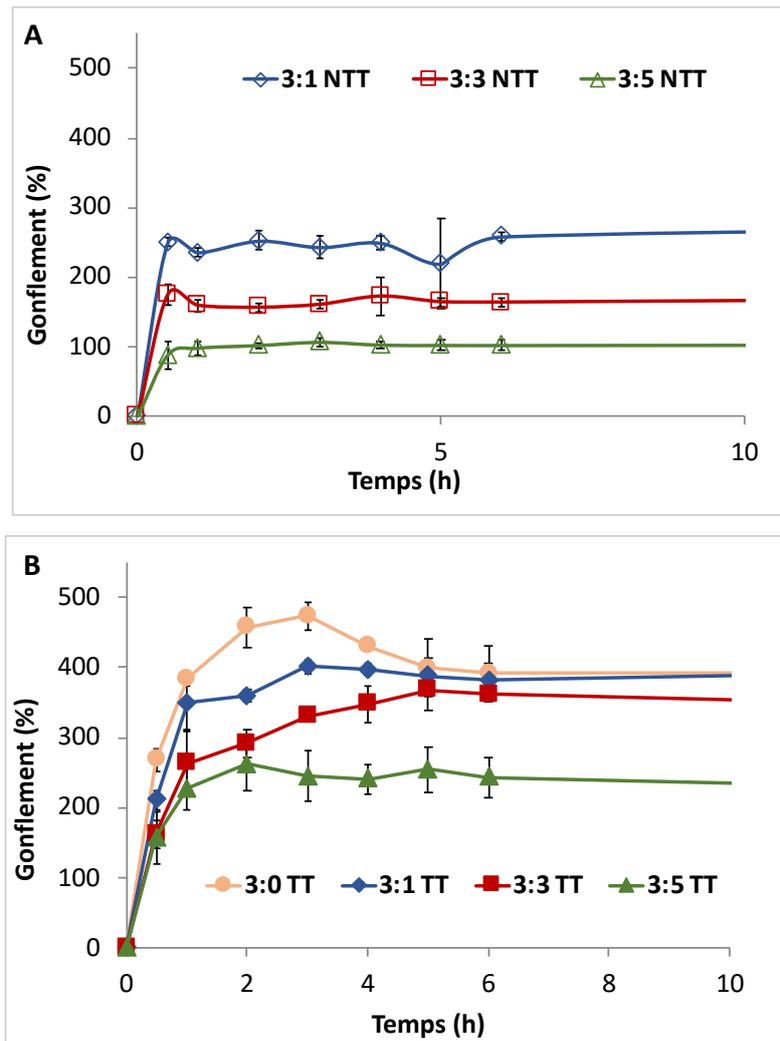


Figure 43 : Profils de gonflement des éponges CHT:PCD non TT (A) et TT (B) dans le PBS pH 7,4 à 37 °C et 80 rpm. N=3 échantillons

Le gonflement des éponges non réticulées montre un profil avec une augmentation très rapide jusqu'à la première heure avant d'atteindre un plateau ($236 \pm 7 \%$, $159 \pm 10 \%$ et $98 \pm 10 \%$ respectivement pour les ratios 3:1 NTT, 3:3 NTT et 3:5 NTT). Les éponges traitées thermiquement contenant du PCD présentent un taux de gonflement qui augmente rapidement la première heure, puis progresse plus lente avant de se stabiliser après 6 h à $393 \pm 40\%$, $382 \pm 24 \%$, $362 \pm 6 \%$ et $244 \pm 29 \%$ respectivement pour les ratios 3:0 TT, 3:1 TT, 3:3 TT et 3: 5 TT). Pour une meilleure analyse des données, les valeurs des taux de gonflements relevées après 24 h de test sont regroupées dans la Figure 44. Ces taux de gonflement sont influencés par deux paramètres principaux :

1) L'augmentation de la proportion de PCD dans les formulations non réticulées entraîne une diminution du taux de gonflement. Nous avons montré lors de l'étude de dégradation que la perte de masse est fonction de la quantité de PCD pour ces échantillons. Le taux de gonflement, est un rapport massique exprimé par la formule : $\frac{mt-m0}{m0} * 100$ (mt : masse finale ; $m0$: masse initiale), qui est influencé par cette perte de matière.

2) Le traitement thermique appliqué aux éponges entraîne le passage des interactions ioniques en liaisons amides qui stabilisent le système et ralentissent la dégradation en milieu aqueux. La perte de masse étant moins importante, le gonflement est moins sous-estimé et donc plus important pour les éponges réticulées. En revanche, pour ces éponges, une diminution de la capacité d'absorption est observée avec l'ajout de PCD à la préparation, car la réticulation des éponges limite le gonflement. La formulation 3:0 TT gonfle donc le plus. Bien que nous puissions observer des taux de gonflement différents, toutes les éponges peuvent gonfler de plusieurs fois leur masse, se comportant comme des superabsorbants.

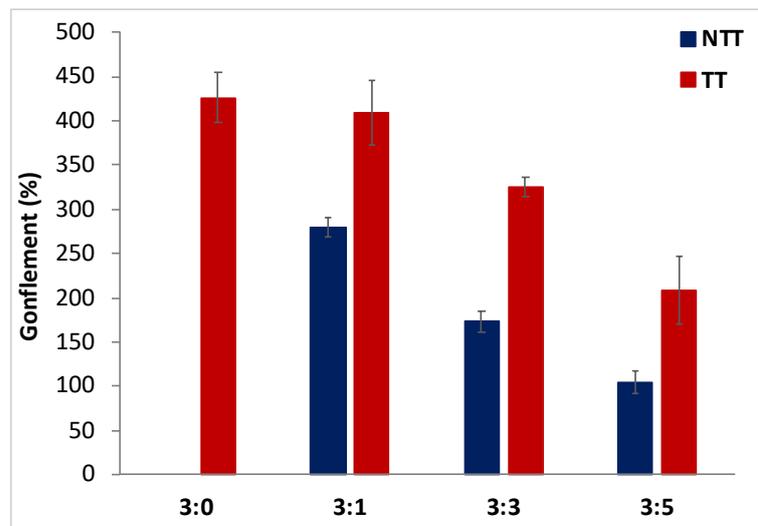


Figure 44 : Taux de gonflement des éponges NTT et TT pour les différentes formulations après 24 heures d'immersion dans le PBS (pH 7.4, 37°C, 80 rpm)

2.5. Propriétés mécaniques des éponges

Il est important de connaître les propriétés mécaniques des éponges pour l'application clinique. Les plaies des DFIs sont des lésions larges et profondes. Le dispositif doit pouvoir être comprimé pour son introduction et retrouver sa forme initiale après expansion dans la plaie

pour combler l'intégralité du défaut, sans exercer une pression trop importante et délétère sur les contours. L'évaluation des propriétés mécaniques a été réalisée en appliquant une déformation de 50 % aux échantillons réhydratés dans une solution de PBS pendant 4 h, à 37 °C et sous agitation (80 rpm). Quelles que soient les éponges testées, des courbes de déformation-contrainte similaires avec deux régions distinctes ont été observées (Figure 45). Le premier cycle correspond à l'augmentation de la contrainte pendant la compression et le deuxième à la diminution de la contrainte lors du retour du piston à sa position initiale. Il faut noter qu'aucune éponge n'a montré de rupture sous cette déformation de 50 %.

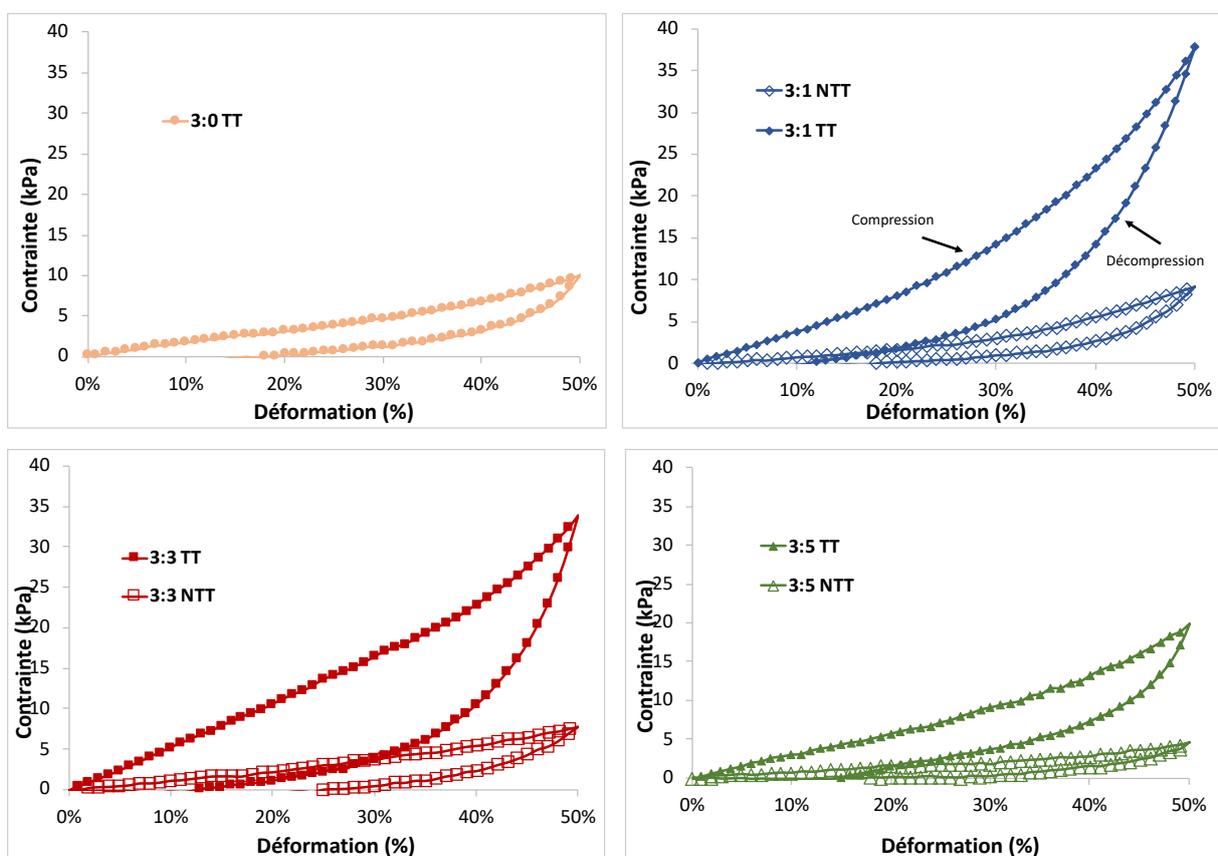


Figure 45 : Courbe de déformation et de retour à la taille initiale en fonction de la contrainte appliquée lors du test de compression-décompression des éponges 3:0 TT, 3:1 NTT/TT, 3:3 NTT/TT et 3:5 NTT/TT à température ambiante après une hydratation dans le PBS pendant 4 h à 37 °C et 80 rpm. N=3 échantillons

Pour chacune des éponges, la déformation résiduelle a été mesurée après relâchement de la compression à 50 % de la taille initiale. Le module de Young de compression a quant à lui été calculé à partir de la portion 0-20 % (région linéaire) du cycle de compression. Il

correspond à la pente de la droite obtenue pour cet intervalle de déformation (229)(280)(281). Les résultats sont illustrés Figure 46 et Tableau 13.

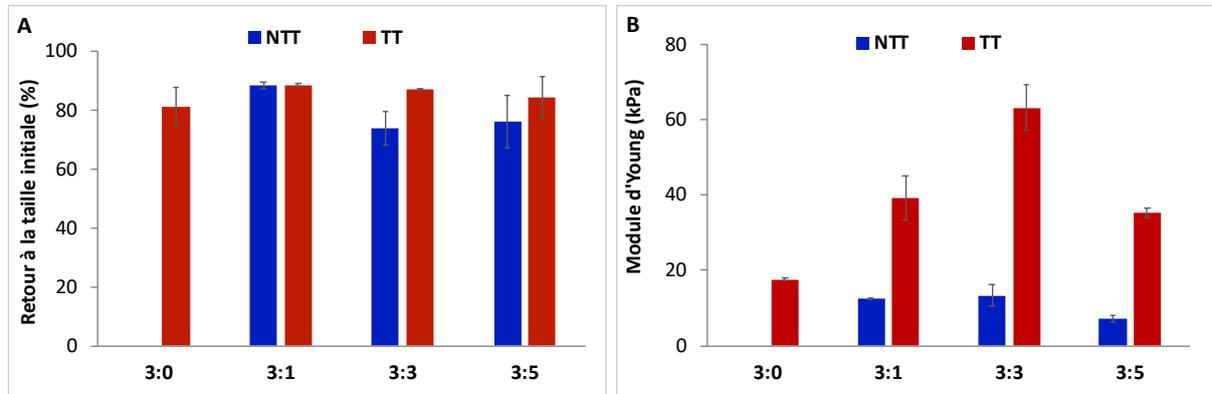


Figure 46 : (A) Évaluation du retour à la taille initiale en pourcentage, après une compression de 50 %, en fonction du ratio pour les éponges CHT:PCD NTT et TT ; (B) Modules de Young en fonction du ratio des éponges CHT:PCD NTT et TT. N=3 échantillons

Tableau 13 : Valeurs de la contrainte mesurée pour une déformation appliquée de 50 %, de la déformation résiduelle après compression et du module de Young pour les éponges des ratios 3 :0 TT, 3 :1, 3 :3 et 3 :5 NTT/TT après une hydratation de 4 h dans une solution de PBS à 37 °C, 80 rpm

	Contrainte		Déformation résiduelle		Module de Young	
	NTT	TT	NTT	TT	NTT	TT
3:0		10 kPa		81 ± 7 %		18 ± 1 kPa
3:1	9 kPa	38 kPa	88 ± 1 %	89 ± 1 %	13 ± 1 kPa	39 ± 6 kPa
3:3	9 kPa	34 kPa	74 ± 6 %	87 %	13 ± 3 kPa	63 ± 4 kPa
3:5	5 kPa	20 kPa	76 ± 9 %	84 ± 7 %	7 ± 1 kPa	35 ± 1 kPa

Lorsque les éponges sont soumises à une déformation de 50 %, elles subissent une faible déformation irréversible de l'ordre de 20 % après relâchement de la force de compression, sans différence significative entre les échantillons ($p > 0,05$) (Figure 46 A et Tableau 13). Après mise en place, les éponges vont regonfler sans exercer de pression sur les contours mais ne couvriront pas toute la surface de la plaie. La déformation plastique est donc à prendre en compte lors de la découpe de l'éponge avec un surdimensionnement de 20 % préconisé. Le

surdimensionnement est une pratique courante en clinique, notamment appliquée au stent (10 à 20 %) pour permettre une apposition correcte (282)(283).

La Figure 46 B et le Tableau 13 montrent l'évolution du module de Young en fonction du ratio CHT:PCD avant et après traitement thermique. Les éponges non réticulées 3:1 NTT et 3:3 NTT présentent des valeurs de modules identiques de 13 kPa et 7 kPa pour les éponges 3:5 NTT. Après traitement thermique, ces valeurs augmentent sensiblement et montrent une dépendance à la quantité de PCD dans la formulation. Ainsi, jusqu'au ratio 3:3 TT, le module de Young augmente de 18 ± 1 kPa pour la formulation 3:0 TT à 63 ± 4 kPa pour la formulation 3:3 TT (pour diminuer ensuite à 35 ± 1 kPa pour la formulation 3:5 TT). La réticulation par traitement thermique consolide les interactions entre les deux polymères, par la formation de liaisons covalentes, entraîne une augmentation de la rigidité du matériau. Comme nous l'avions déjà montré, le ratio 3:3 correspond au meilleur équilibre entre les fonctions amines du CHT et carboxyliques de PCD (Tableau 13). Il est logiquement celui qui possède la rigidité la plus élevée. Par ailleurs, les analyses au MEB des éponges 3:5 TT ont montré une microstructure différente de celles des autres formulations, avec une perte de la porosité et donc de la microarchitecture spongieuse avec un épaissement des parois dû à la présence d'un excès de PCD (Figure 39). Or, cette microarchitecture spongieuse permet la coalescence des pores qui protège le matériau pendant la compression (284). La structure du ratio 3:5 TT entraîne donc une diminution de la résistance mécanique à la compression. Le dispositif sera majoritairement en contact avec la peau dont le module de Young est du même ordre que les éponges réticulées, soit environ 50 kPa (285). Une éponge caractérisée par un module de Young trop faible montrera une mauvaise résistance mécanique et risquera de se déformer et de ne pas recouvrir toute la surface de la plaie infectée. A l'inverse, une valeur trop importante de module aura pour conséquence une rigidité du matériau qui appliquera une pression trop importante sur les berges de la plaie. Les éponges 3:1 TT, 3:3 TT et 3:5 TT possèdent donc les propriétés mécaniques les plus compatibles avec l'application clinique que nous ciblons.

2.6. Évaluation de la cytotoxicité des éponges

Les infections du pied diabétique sont graves et comportent très souvent une atteinte osseuse. Le dispositif est destiné à être implanté dans la lésion et sera donc en contact avec

la peau et l'os. Afin d'évaluer la cytotoxicité des éponges au regard de la norme ISO10993-5, des cellules préostéoblastes ont été utilisées.

L'absence de cytotoxicité est définie par un taux de survie cellulaire supérieur à 70 % selon la norme ISO 190993-5. La Figure 47 présente le pourcentage de viabilité cellulaire par la méthode de l'extrait. L'extrait est obtenu par immersion des éponges NTT et TT dans un milieu de culture pendant 24 heures, qui est ensuite filtré. Une viabilité cellulaire supérieure à 70 % est observée pour toutes les éponges avec des valeurs qui tendent à augmenter lorsque celles-ci sont réticulées. En revanche, les analyses statistiques n'ont pas mis en évidence de différence significative entre les éponges d'un même ratio, réticulées ou non ($p > 0,05$). Ces résultats confirment les travaux des Drs Flores et Palomino-Durand qui avaient déjà prouvé l'absence de cytotoxicité avec leurs éponges également à base de CHT et de PCD (61)(110)(109).

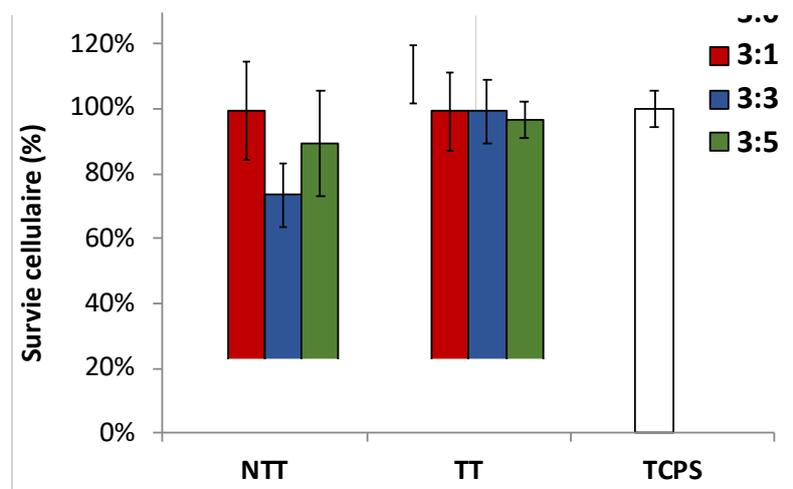


Figure 47 : Viabilité cellulaire des éponges de CHT:PCD NTT (3:1, 3:3 et 3:5) et TT (3:0, 3:1, 3:3 et 3:5) par la méthode de contact indirect avec des cellules préostéoblastes MC3T3-E1 (contrôle TCPS). N=18 échantillons

3. Conclusion

Cette première partie a permis de concevoir et de caractériser les éponges dans le but d'élaborer un dispositif médical répondant au cahier des charges en termes de viscoélasticité,

d'absorption, de résistance mécanique, de dégradation et de cytocompatibilité. Plus spécifiquement, nous avons étudié l'impact du ratio CHT:PCD et du traitement thermique sur les propriétés physico-chimiques, les propriétés mécaniques et sur la cytotoxicité des éponges.

Les tests rhéologiques ont permis de prouver les propriétés viscoélastiques des hydrogels et leur formation immédiate dès l'acidification de la suspension CHT:PCD dans les seringues connectées. Nous avons également constaté que l'ajout de PCD dans la formulation de l'hydrogel permet de stabiliser le système par augmentation des interactions électrostatiques (le ratio 3:3 montre l'équilibre optimal).

L'analyse des images MEB des éponges n'a pas mis en évidence de différences de la microarchitecture avant et après traitement thermique. Cependant, l'impact de la quantité du PCD a pu être constaté. Une disparition du contour des pores par épaissement des parois est observée avec l'ajout de PCD dans la formulation, notamment pour le ratio 3:5.

La réticulation a permis de significativement améliorer la stabilité des dispositifs en milieu aqueux, leurs capacités d'absorption et leur résistance mécanique. Les éponges 3:1 TT, 3:3 TT et 3:5 TT ont montré des modules de Young très proches de celui de la peau.

L'ensemble de ces résultats confirme l'importance du traitement thermique, qui apporte stabilité et améliore les performances des dispositifs. A l'issue de ces tests, il nous est donc possible de conclure que les dispositifs répondant le mieux au cahier des charges sont les échantillons traités thermiquement. Par ailleurs, les éponges réticulées les moins performantes en terme d'absorption sont les éponges 3:5 TT. Nous avons donc fait le choix de ne continuer à travailler qu'avec les formulations 3:1 et 3:3 réticulées qui paraissent optimales pour une application clinique destinée à traiter les infections du pied diabétique. Les éponges 3:0 TT sont les moins compatibles en terme de propriétés mécaniques (module de Young faible) mais nous serviront de contrôle pour les différentes études.

Partie 2 : Étude *in vitro* du chargement et de la libération des principes actifs

Notre objectif est d'élaborer un dispositif médical sous forme d'éponge qui libère localement des agents antibactériens. Il sera imprégné dans les services de soins par le praticien, dans une solution d'ATB pour être déposé sur la plaie infectée. Cette deuxième partie est consacrée à l'étude de l'absorption et de la libération de la ciprofloxacine (CIP) et de la rifampicine (RFP) par les éponges. Les ATBs sélectionnés sont les traitements de référence des infections du pied diabétique. Les bactéries Gram- sont particulièrement sensibles aux fluoroquinolones, et les bactéries Gram+ à la RFP. De plus, cette dernière présente une bonne diffusion dans les biofilms. L'association de ces deux molécules permettra *in fine* d'avoir un spectre antibactérien large. La CIP utilisée est sous la forme d'une solution pour perfusion prête à l'emploi (200 mg/mL) et la RFP est une poudre à reconstituer dans l'eau ppi (pour préparation injectable) dont la concentration peut être modulée. Dans un premier temps, l'impact du ratio (CHT:PCD) et des paramètres d'imprégnation des éponges dans les solutions d'ATBs sur leur capacité à les absorber ont été évalués. Puis, la libération des principes actifs a été étudiée à l'aide d'un système dynamique de libération en flux continu. Ce modèle *in vitro* est un moyen de se rapprocher des conditions du vivant en mimant la circulation des fluides biologiques.

1. Étude des paramètres de chargement des principes actifs

1.1. Interactions CD/antibiotiques

La formation de complexes d'inclusion entre les principes actifs et les CDs ou le PCD est largement rapportée dans la littérature, notamment pour améliorer leur solubilité ou contrôler leur profil de libération (184)(183)(182)(188). La formation du complexe d'inclusion CIP-CD et CIP-PCD n'a donc pas été étudiée dans cette thèse.

Notre laboratoire a récemment montré une amélioration de la solubilité de la CIP en présence de concentrations croissantes de méthyl β CDs (286). Blanchemain et *al.* ont montré par analyse RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) du proton, la formation d'un complexe CIP-méthyl- β CD avec une stœchiométrie de 1:1. Les interactions dipolaires entre l'ATB et la CD ont été mises en évidence par RMN 2D (ROESY) et la géométrie du complexe d'inclusion entre les deux composés a été déterminée. Le groupement pipérazine de la CIP est inclus dans la cavité de la CD (Figure 48 (287)). D'autres équipes de recherche ont également observé une amélioration de la solubilité de la CIP en présence de β CD. La stœchiométrie 1:1 du complexe a également été caractérisée par RMN et par DRX (diffractométrie de rayons X) (288)(289).

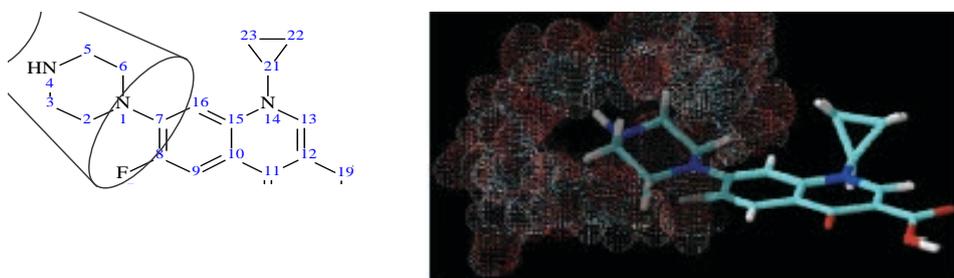


Figure 48 : (A) Géométrie de l'inclusion de la ciprofloxacine dans un cyclodextrin.

Le complexe d'inclusion RFP- β CD a également été rapporté dans la littérature. Les études ont montré une amélioration de la solubilité de l'ATB en présence de β CDs suggérant la formation d'un complexe. Une stœchiométrie 1:1 de ce complexe est supposée par les auteurs étant donné la taille de la molécule de RFP. L'évaluation des propriétés thermiques (DSC - calorimétrie différentielle à balayage) a mis en évidence la diminution de l'intensité du pic de fusion endothermique de la RFP lorsqu'elle est associée à la CD, ce qui est dû à une interaction de l'ATB avec la CD. L'inclusion a également été investiguée par DRX qui montre une diminution de la cristallinité de la rifampicine en présence de la CD. Enfin, l'analyse des spectres de la RFP, de la β -CD et du mélange a été analysé par IRFT, RMN 1D et 2D. La RMN du proton a permis de confirmer l'inclusion RFP- β CD par le groupement pipérazine de la RFP (Figure 49) dans la CD (290)(291)(292)(293).

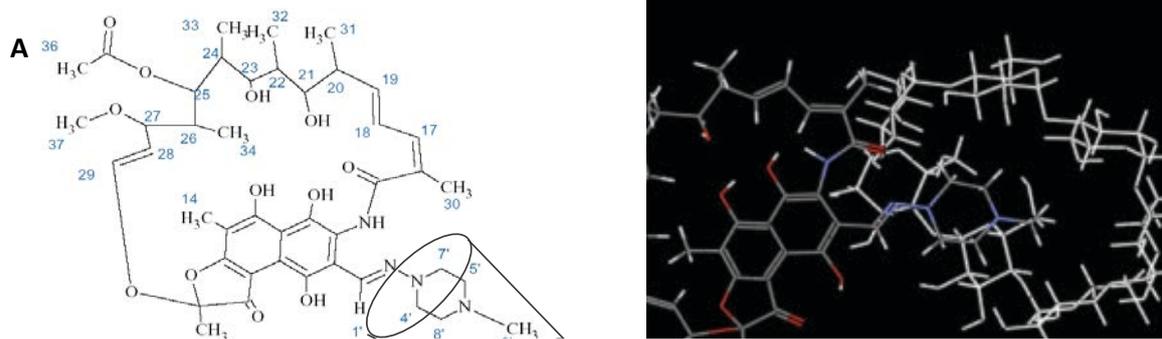


Figure 49 : (A) Géométrie de l'encapsulation de la RFP par son groupement pipérazine dans la β CD ; (B) Modèle de représentation 3D (284)

1.2. Influence du temps de chargement

1.2.1. Chargement de la ciprofloxacine

Dans le cadre des travaux de thèse du Dr. Flores, une étude préliminaire de la libération a été réalisée à partir des éponges de CHT:PCD (3:3) imprégnées pendant 4 h dans une solution de CIP à 2g/L (110). Dans notre étude, nous avons évalué différents temps d'imprégnation (de 15 minutes à 24 heures) pour une concentration fixe de CIP à 2 g/L. Cette étude permet de déterminer l'impact du temps d'imprégnation sur la capacité d'absorption des éponges réticulées (3:0 TT, 3:1 TT et 3:3 TT). Pour une utilisation clinique, un temps d'imprégnation court serait nécessaire. La quantité de CIP absorbée par les éponges a été déterminée après immersion dans une solution de PBS pendant 24 h à 37°C sous agitation 80 rpm par dosage à 270 nm. Une étude préliminaire a permis de vérifier qu'après 24 h d'immersion dans du PBS, les éponges ne libéraient plus de principe actif. Les cinétiques d'absorption sont présentées sur les Figure 50 A et B.

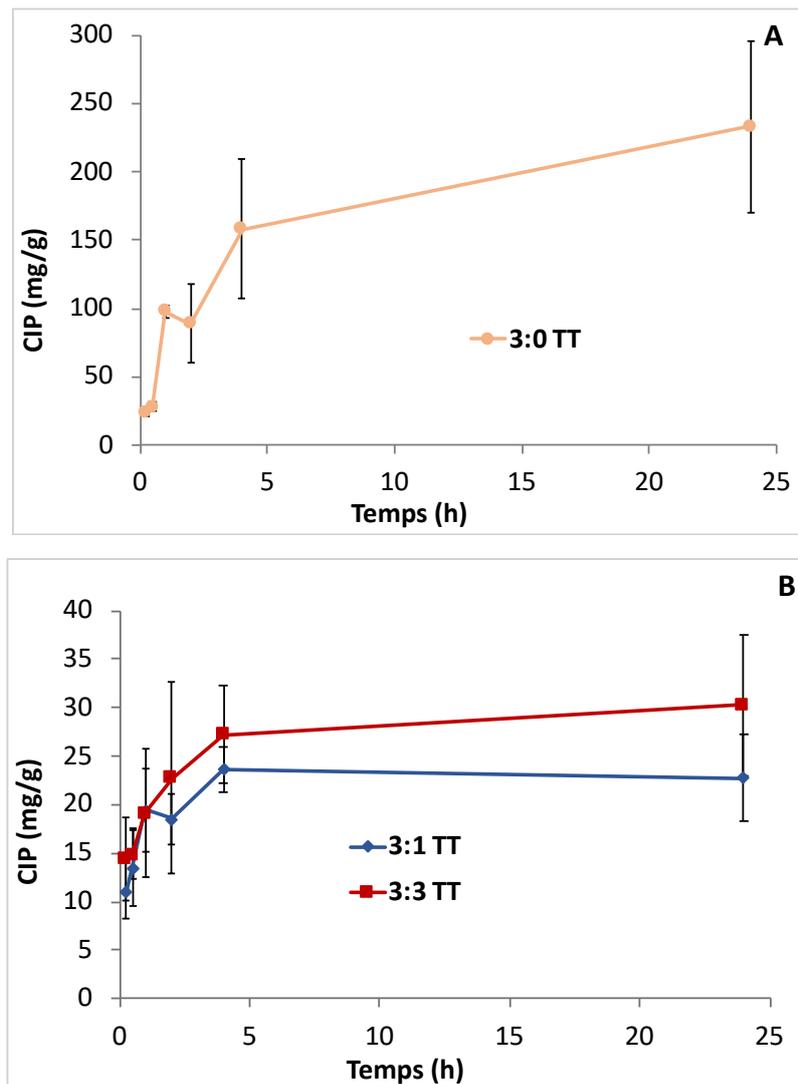


Figure 50 : Évaluation de la quantité de CIP absorbée après une imprégnation dans la CIP (2 g/L) pendant 15 min à 24 h. L'étude a été réalisée en triplicata pour les éponges 3:0 TT (A), 3:1 et 3:3 TT (B). N=3 échantillons

Les éponges 3:0 TT (Figure 50 A), ne contenant pas de PCD, montrent une augmentation rapide de la quantité de CIP absorbée lors des quatre premières heures d'imprégnation (158 ± 51 mg/g). Pour des temps d'imprégnation plus longs, aucune différence significative n'a été observée ($p > 0,05$). Les cinétiques d'absorption de la CIP dans les éponges 3:1 TT et 3:3 TT sont similaires avec une absorption rapide de l'antibiotique jusqu'à 4 h (24 ± 2 mg/g et 27 ± 5 mg/g respectivement) suivie d'un plateau. Ces résultats peuvent être corrélés à ceux obtenus lors de l'étude du gonflement. En effet, l'absorption des principes actifs dans les éponges est étroitement liée aux caractéristiques de gonflement. Nous avons observé que le taux de gonflement augmentait très rapidement la première heure (à 1 h : 3:0 TT : 384 ± 10 %, 3:1 TT :

349 ± 38 % et 3:3 TT : 264 ± 43 %) suivi d'une augmentation plus lente jusqu'à la 4^{ème} heure (3:0 TT : 430 ± 4 %, 3:1 TT : 396 ± 9 % et 3:3 TT : 168 ± 24 %) avant d'atteindre un plateau. La stabilisation de la quantité de CIP absorbée par les éponges est donc en relation avec la stabilisation de leur taux de gonflement. Il faut aussi noter que la quantité absorbée après 4 h d'imprégnation par les éponges 3:0 TT (233 ± 62 mg/g) est beaucoup plus importante que celles des ratios 3:1 TT (24 ± 2 mg/g) et 3:3 TT (27 ± 5 mg/g). Il a été démontré dans la première partie que le taux de gonflement diminue avec l'augmentation de la quantité de PCD dans la formulation. Néanmoins, les différences observées en terme de taux de gonflement des éponges ne permettent pas à elles seules de justifier les différences en terme de quantité de CIP absorbée par les éponges 3:0 TT, 3:1 TT et 3:3 TT. En effet, alors que le taux de gonflement chute de 8 % entre les éponges 3:0 TT et 3:1 TT et de 61 % entre les éponges 3:0 TT et 3:3 TT, la quantité de CIP est diminuée de 89 % et de 88 % après 4 heures de chargement. Le taux de gonflement n'est donc pas le seul phénomène impactant l'absorption de la CIP dans les éponges. De plus, les analyses statistiques ne permettent pas de mettre en évidence de différences significatives entre les quantités de CIP absorbées par les éponges 3:1 TT et 3:3 TT quel que soit le temps d'imprégnation, alors qu'une différence significative était observée en terme de taux de gonflement.

La formulation 3:0 TT absorbe la quantité de CIP la plus importante, ce qui permet de supposer une interaction entre l'antibiotique et le CHT. Les fluoroquinolones telles que la CIP sont connues pour être sous forme de zwitterion à pH physiologique (195)(196). Un zwitterion est une molécule possédant des charges électriques de signes opposés. Ainsi, la CIP est chargée positivement et négativement à un pH physiologique (pH 7,4). La charge négative est portée par le groupement carboxylate de la CIP et la charge positive par le cycle pipérazine protoné. La CIP peut donc interagir via des interactions ioniques par l'intermédiaire de ses groupes carboxylates avec les fonctions amines primaires protonées du CHT. Lors de la formation des hydrogels, la quantité massique de PCD est inférieure (3:1) ou égale (3:3) à la quantité de CHT. Ainsi, les fonctions carboxylates (4 mmol/g de PCD (199)) du PCD sont en interaction avec les fonctions amines du CHT (5 mmol/g de CHT (254)) (Tableau 11). L'antibiotique sous sa forme zwitterion interagit avec les groupements NH_3^+ libres du CHT. Or, le nombre de groupements amines libres est diminué dans les formulations 3:1 et 3:3 (par

consommation de ces derniers par les fonctions carboxylates du PCD) elles absorbent donc moins d'antibiotique.

Nous aurions pu attendre de plus grandes quantités de CIP avec l'inclusion dans la CD. En effet, il a été montré que le complexe d'inclusion de la CIP dans la CD est principalement dû aux interactions dipolaires, hydrophobes, et aux forces de Van der Waals (199). Néanmoins la constante de complexation avec par exemple un polymère de méthyl β CD, calculée par la loi de Benesi-Hildebrand, est très faible ($K_{1:1} = 55,92 \text{ M}^{-1}$ (286)). De plus, la CIP dans la préparation pour perfusion hospitalière utilisée pour imprégner les éponges est sous sa forme chlorhydrate (soluble), ce qui n'est pas en faveur de la formation d'un complexe d'inclusion. La CD est généralement utilisée pour améliorer la solubilité des molécules hydrophobes par formation de complexes d'inclusion. La CIP chlorhydrate étant hydrophile, elle interagit peu avec la cavité hydrophobe de la CD.

On peut donc conclure que l'absorption et l'adsorption de la CIP dépendent du taux de gonflement, et surtout des interactions électrostatiques avec le CHT.

En augmentant la quantité de PCD dans la formulation, la formation d'un complexe d'inclusion et d'interactions électrostatiques avec celui-ci aurait pu être mise en évidence. Néanmoins, ces échantillons ne formant pas d'éponges conformes au cahier des charges, n'ont donc pas été considérés.

Pour évaluer le type d'interactions impliquées dans l'adsorption de la CIP sur les éponges, le mécanisme d'adsorption a été étudié par une modélisation cinétique selon deux modèles :

- La forme linéaire du modèle cinétique du pseudo premier ordre : (294)

$$\ln(Q_e - Q_t) = \ln Q_e - \frac{K_1 t}{2,303}$$

- La forme linéaire du modèle cinétique du pseudo second ordre : (295)

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{K_2 Q_e^2} + t/Q_e$$

Q_e et Q_t (mg/g) sont les concentrations de CIP à l'équilibre et au temps « t », et K_1 (min^{-1}) et K_2 (g/mg.min) sont les constantes cinétiques du pseudo premier ordre et du pseudo second ordre. Le modèle cinétique du pseudo premier ordre est caractérisé par la physisorption qui correspond à la formation de liaisons physiques de types Van der Waals et hydrogène. Le modèle cinétique du pseudo second ordre quant à lui définit une adsorption de type chimisorption qui est caractérisée par des liaisons chimiques telles que les interactions ioniques ou les liaisons covalentes.

D'après le Tableau 14 et la Figure 51 les valeurs des coefficients de corrélation du pseudo second ordre sont très proches de 1 par rapport à l'autre modèle. Les valeurs des quantités adsorbées « $Q_{e, \text{cal}}$ » calculées par ce modèle sont comparables à celles expérimentales « $Q_{e, \text{exp}}$ » obtenues. Ceci montre que la cinétique d'adsorption répond mieux au modèle cinétique du pseudo second ordre (Figure 51), suggérant une chimisorption de la CIP sur les éponges (296). Ces résultats confirment donc les interactions préférentielles de la CIP sous sa forme zwitterion avec les groupements amines protonés libres du CHT.

Tableau 14 : Paramètres cinétiques du modèle du pseudo premier ordre et du pseudo second ordre de l'adsorption de la CIP (2 g/L) par les éponges des ratios 3:0 TT, 3:1 TT et 3:3 TT imprégnées de 15 min à 24 h

Ratio	C_0 (g/L)	$Q_{e, \text{exp}}$ (mg/g)	Premier ordre			Second ordre		
			K_1 (min^{-1})	$Q_{e, \text{cal}}$ (mg/g)	r^2	K_2 (g/mg.min)	$Q_{e, \text{cal}}$ (mg/g)	r^2
3:0 TT	2	233	0,187	209	0,996	0,002	256	0,977
3:1 TT	2	23	0,810	5	0,305	0,259	23	0,999
3:3 TT	2	30	0,576	14	0,777	0,074	31	0,998

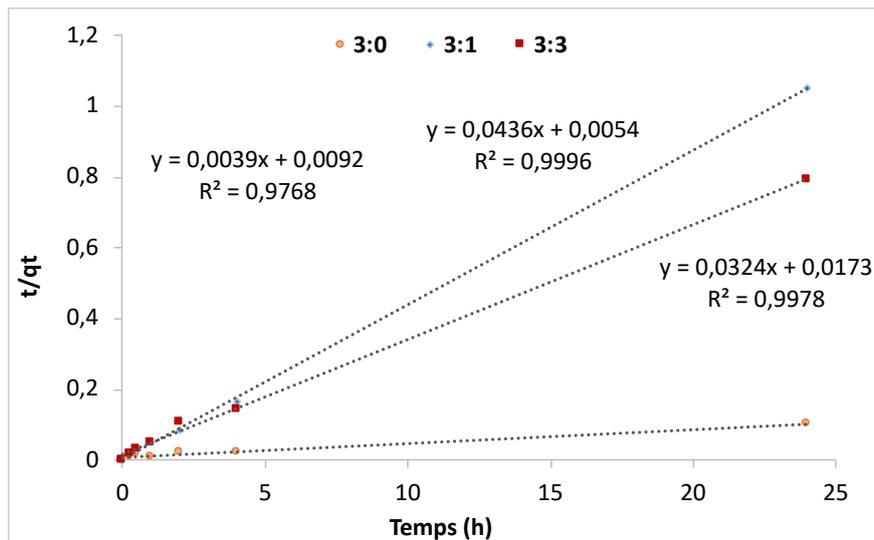


Figure 51: Représentation linéaire du modèle cinétique de pseudo deuxième ordre pour les éponges 3:0 TT, 3:1 TT et 3:3 TT imprégnées de CIP (2 g/L) pendant 15 min à 24 h

1.2.2. Chargement de la rifampicine

L'influence du temps d'imprégnation sur la capacité d'absorption des éponges dans une solution de RFP a également été étudiée. Les éponges sont imprégnées de 15 min à 72 h dans une solution reconstituée de RFP dans l'eau pour préparation injectable (ppi) à 12 g/L qui constitue la concentration habituellement utilisée dans le milieu hospitalier sous 80 rpm. Les résultats des cinétiques d'absorption sont présentés Figure 52.

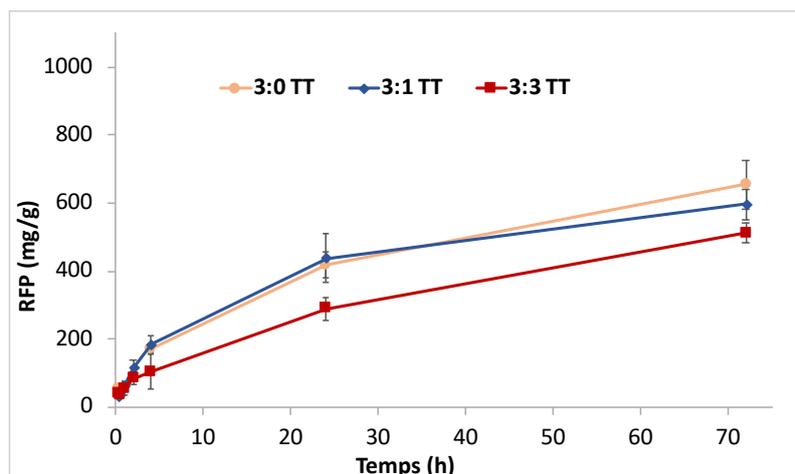


Figure 52 : Évaluation de la quantité de RFP absorbée par les éponges 3:0 TT, 3:1 TT et 3:3 TT imprégnées dans la RFP (12 g/L) en fonction du temps d'imprégnation. N=3 échantillons

La Figure 52 montre que l'absorption de la RFP augmente pour toutes les formulations en fonction du temps d'imprégnation. Des quantités maximales de 654 ± 71 mg/g, 597 ± 45 mg/g et 513 ± 30 mg/g sont relevées à 72 h respectivement pour les éponges 3:0 TT, 3:1 TT et 3:3 TT. Néanmoins, une différence statistique n'est observée qu'à partir des temps d'imprégnation longs de 24 et 72 h ($p > 0,05$). Seuls des temps de chargement importants ont une influence sur la capacité d'absorption. On observe que la quantité de RFP absorbée par les éponges 3:3 TT est inférieure à celle des éponges 3:0 TT ou 3:1 TT. Tout comme dans l'étude précédente, ceci est en lien avec le taux de gonflement et les interactions entre la RFP et le CHT. En effet, comme pour la CIP, la RFP est un zwitterion à pH physiologique (297). Dans le cas de l'éponge 3:0 TT, le groupement hydroxyle phénolique porté par le carbone 8 est chargé négativement et peut interagir avec les NH_3^+ du CHT. Nous avons décrit précédemment que les fonctions carboxylates du PCD sont en interaction avec les fonctions amines du CHT pour former l'hydrogel. Comme pour la CIP, certaines fonctions NH_3^+ en interaction avec le PCD ne sont pas disponibles pour la RFP, ce qui explique cette diminution de capacité d'absorption des éponges 3:3 TT comparativement aux éponges 3:0 TT. Cette diminution d'absorption de RFP n'est pas compensée par son inclusion dans les CDs. Malgré l'inclusion de la RFP dans la CD, la constante de complexation est faible ($K_{1:1} = 73,4 \text{ M}^{-1}$ pour la méthyl β -CD et $K_{1:1} = 68,5 \text{ M}^{-1}$ pour l'hydroxypropyl β -CD (298)). Néanmoins et contrairement à la CIP, on observe que la quantité de RFP continue d'augmenter avec le temps d'imprégnation et ne se stabilise pas lorsque le taux de gonflement maximal est atteint. La RFP est capable d'interagir « avec elle-même » en s'auto associant via des interactions π - π (aussi appelées « p-stacking »). Cette spécificité a notamment été mise en évidence par Taha *et al.* grâce à une étude isotherme d'adsorption de la RFP sur un support de titane revêtu d'hydroxyapatite, fonctionnalisé par un PCD et chargé par de la gentamicine, ce qui conférait à la surface une charge positive (299). La RFP pouvait interagir avec la gentamicine par interactions ioniques. Cette étude a montré que l'augmentation du temps d'imprégnation des échantillons dans la solution de RFP améliorerait la capacité d'adsorption par formation de plusieurs couches de molécules de RFP qui se superposaient. La modélisation de l'adsorption par un modèle de Freundlich est venue confirmer cette hypothèse. De ce fait, le même phénomène pourrait se produire au sein des éponges. Néanmoins, les supports de cette étude et les nôtres étant très différents et non comparables, une analyse isotherme d'adsorption de la RFP par les éponges

avec plusieurs concentrations de RFP doit être menée pour pouvoir conclure à la formation de ce phénomène.

Afin d'évaluer le type d'interactions de la RFP avec les éponges, une étude du mécanisme d'adsorption a été réalisée par une modélisation selon les deux précédents modèles. Les valeurs des coefficients de corrélation obtenus avec les deux modèles sont proches de 1 et très similaires (Tableau 15) ne permettant donc pas de déterminer l'ordre cinétique. En revanche, la valeur de la quantité adsorbée « Q_e , ca » (calculées) pour la formulation 3:0 TT par le modèle cinétique de pseudo second ordre est très comparable à celle obtenue expérimentalement « Q_e , exp ». L'adsorption de la RFP par l'éponge 3:0 TT suit donc un modèle cinétique de pseudo ordre 2 (Figure 53 A) caractérisé par une chimisorption. En effet, l'adsorption de l'ATB sur cette éponge n'est soumise qu'à des interactions ioniques avec les groupes amines libres du CHT. Concernant les formulations contenant du PCD, les quantités adsorbées « Q_e , ca » (calculée) sont équivalentes à celles obtenues expérimentalement « Q_e , exp » quel que soit le modèle d'ordre cinétique. Ces observations suggèrent la coexistence des deux modèles pour ces éponges (Figure 53 A et B). L'adsorption de la RFP par les formulations 3:1 TT et 3:3 TT répondrait à des phénomènes de chimisorption (interaction ionique avec le CHT) et de physisorption par formation d'interactions de faible énergie de types Van der Waals et hydrophobe.

Tableau 15 : Paramètres cinétiques des modèles du pseudo premier ordre et du pseudo second ordre de l'adsorption de la RFP (12 g/L) par les éponges des ratios 3:0 TT, 3:1 TT et 3:3 TT imprégnées de 15 min à 72 h

Ratio	C_0 (g/L)	Q_e , exp (mg/g)	Premier ordre			Second ordre		
			K_1 (min ⁻¹)	Q_e , cal (mg/g)	r^2	K_2 (g/mg.min)	Q_e , cal (mg/g)	r^2
3:0 TT	12	654	0,0750	802	0,9696	0,0001	667	0,9469
3:1 TT	12	597	0,0922	632	0,983	0,0002	667	0,979
3:3 TT	12	512	0,0567	575	0,9584	0,0001	556	0,9257

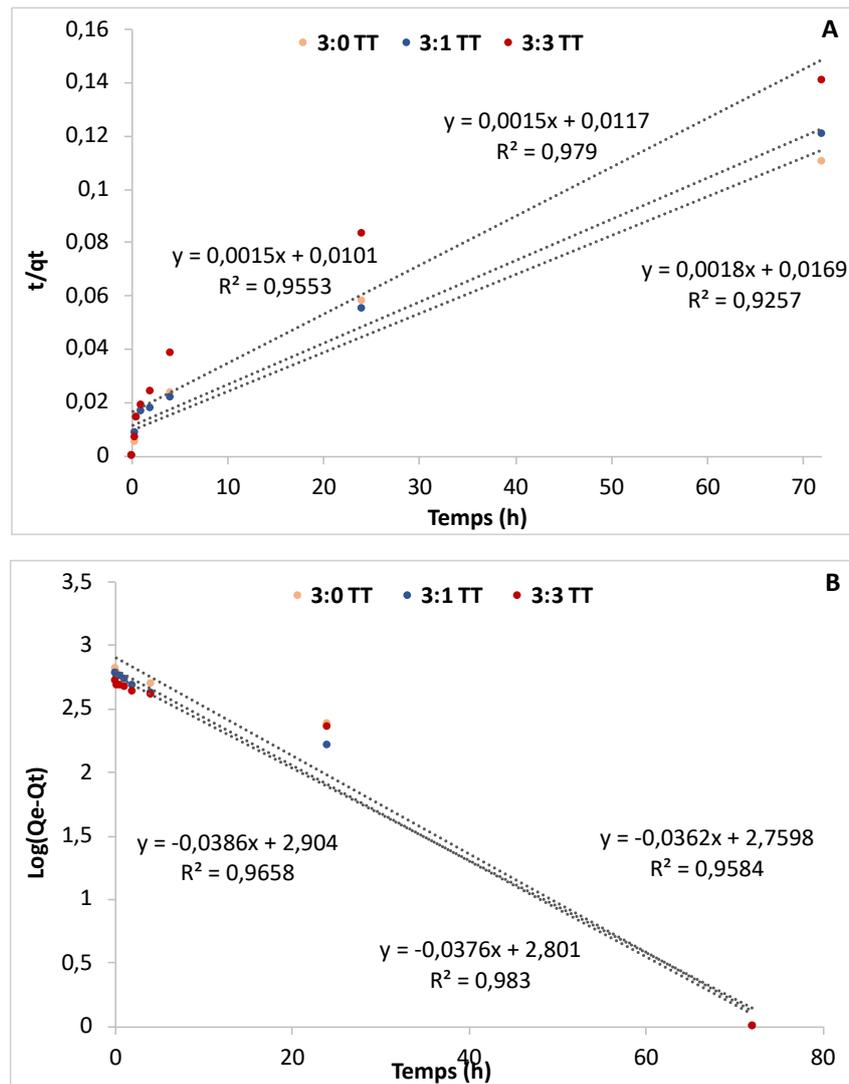


Figure 53 : Représentation linéaire du modèle cinétique du pseudo premier ordre (A) et du pseudo second ordre (B) pour les éponges 3:0 TT, 3:1 TT et 3:3 TT imprégnées de RFP à 12 g/L pendant 15 min à 72 h.

1.2.3. Conclusion

Pour conclure, cette étude a montré qu'un temps d'imprégnation de 4 h est suffisant pour charger les éponges avec la CIP. L'absorption de la RFP augmente avec le temps de chargement (maximum observé après 72 h de chargement). En pratique clinique, un temps d'imprégnation court est idéal car le dispositif sera imprégné d'ATBs sur place par l'équipe de soignants avant l'insertion dans la plaie. De plus, le changement des pansements des plaies des infections du pied diabétique est effectué tous les 1 à 3 jours maximum. Il est donc nécessaire de pouvoir préparer le dispositif antibactérien de façon rapide en fonction des

besoins. *In fine*, l'éponge est destinée à être imprégnée dans une association de CIP et de RFP. En effet, la RFP peu active sur les pathogènes Gram- doit être utilisée en association avec la CIP à large spectre pour éviter le risque de sélection de résistances bactériennes. Pour la suite des travaux, les éponges CIP, RFP et CIP-RFP seront en conséquence, imprégnées 4 heures afin d'évaluer leurs performances.

2. Étude de la libération des principes actifs en mode dynamique

2.1. Étude de la libération de la ciprofloxacine

L'étude *in vitro* de libération de la CFX en condition dynamique a été réalisée dans un appareil de dissolution en flux continu avec un débit fixé à 5 mL/min. Les DFIs sont souvent associées à une atteinte osseuse mais il n'existe pas de données dans la littérature permettant d'estimer la perfusion de l'organe une fois l'infection installée. Le choix du débit s'est donc inspiré des travaux de Wootton et *al.* qui ont rapporté que la perfusion d'un os cortical chez un sujet sain est de 5 mL/min/100 g (300). Les quantités libérées et les cinétiques de libération sont présentées Figure 54.

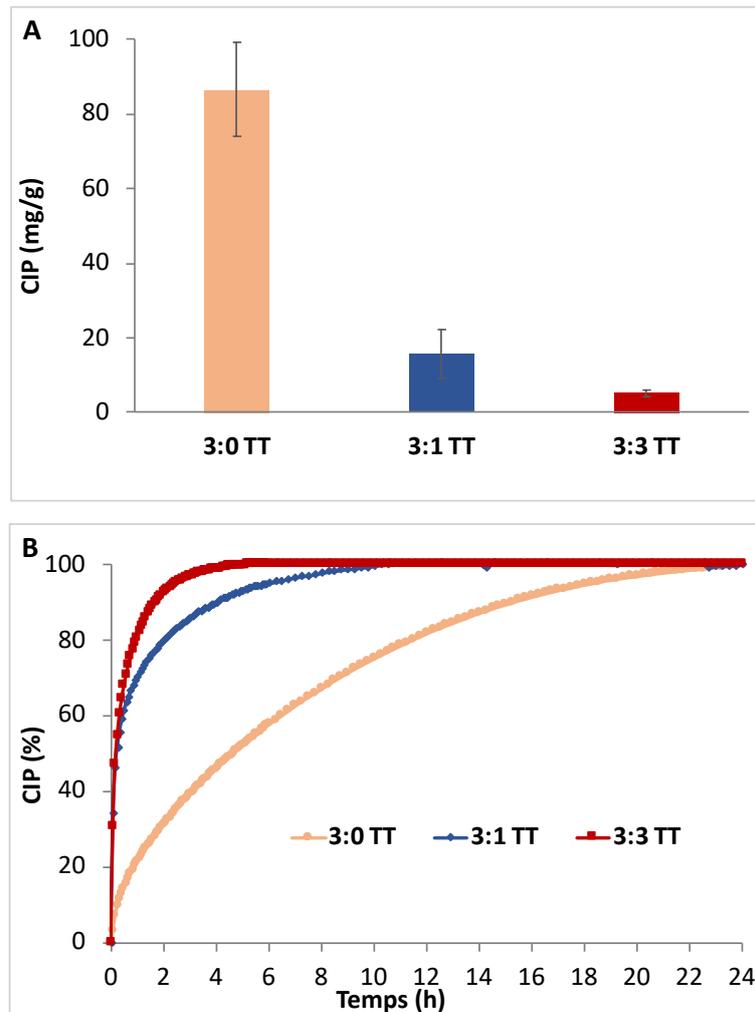


Figure 54 : Quantité de ciprofloxacine libérée par les éponges (A) après 4 h d'imprégnation dans une solution de CIP (2 g/L) et 24 heures de libération dans le PBS ; profils de libération (B) des éponges 3:0 TT, 3:1 TT et 3:3 TT après une libération en conditions dynamiques (Sotax UPS4, 37°C, 5 mL/min) dans une solution de PBS à pH 7,4. N=6 échantillons

La Figure 54 A montre que les éponges 3:0 TT absorbent une quantité de CIP (87 ± 13 mg/g) beaucoup plus importante que les éponges contenant le PCD. Nous constatons également que la quantité de CIP absorbée diminue avec l'augmentation de la proportion de PCD dans la formulation de l'éponge. Ainsi, la formulation 3:1 TT libère en 3 fois plus d'ATB (16 ± 6 mg/g) que la formulation 3:3 TT (5 ± 1 mg/g) après 24 heures. Cette tendance est la même que celle observée lors de l'étude précédente (partie 2 1.1). En revanche, il faut souligner que les quantités de CIP absorbées par une même éponge sont différentes. En effet, nous avons constaté après une imprégnation de 4 h des éponges dans une solution de CIP (2g/L), des capacités d'adsorption plus importantes (158 ± 51 mg/g, 24 ± 2 mg/g et 27 ± 5 mg/g respectivement pour les ratios 3:0 TT, 3:1 TT et 3:3 TT) que celles obtenues avec ce nouveau

lot d'éponges (87 ± 13 mg/g, 16 ± 6 mg/g et 5 ± 1 mg/g respectivement pour les ratios 3:0 TT, 3:1 TT et 3:3 TT). La reproductibilité n'est donc pas bonne d'un lot de fabrication à l'autre probablement à cause de la microstructure qui impacte directement le taux de gonflement de l'éponge. Les paramètres de température de congélation sont déterminants dans la formation de la taille et de la forme des cristaux de glace qui forment la microarchitecture de l'éponge après lyophilisation. Les caractéristiques de ces cristaux dépendent de la température de nucléation de la glace très tôt lors du processus de congélation. Cette microarchitecture est aussi influencée par la vitesse de refroidissement et le temps nécessaire à la prise de glace (216). Or, ces paramètres sont difficilement contrôlables, entraînant des variabilités de microstructures intra et inter lots qui influencent l'absorption et la libération du principe actif. Lui et *al.* ont montré que la congélation en deux étapes améliore l'homogénéité intra échantillons. Cette méthode consiste en une première phase de congélation jusqu'à -10 °C, suivie d'une deuxième phase pour atteindre la température plus basse de -45 °C avec une rampe de congélation constante (301). Les variations inter lots sont la conséquence du phénomène stochastique de la nucléation. Pour homogénéiser les productions il faudrait contrôler la température de cette nucléation dans tous les récipients servant de moules, par l'ajout d'un agent de nucléation dans la préparation (216). Au laboratoire, nous avons noté une meilleure reproductibilité pour des échantillons de petite taille (tube Falcon \varnothing 12 mm, 8 mL) placés en position horizontale et au centre du lyophilisateur. Pour améliorer l'homogénéité intra lots, un traitement aux ultrasons des hydrogels avant la congélation pourrait être également appliqué.

L'évaluation de la cinétique de libération (Figure 54 B) met en évidence deux profils différents. Les éponges 3:1 TT et 3:3 TT montrent une cinétique de libération avec un effet « *burst* » puis un plateau atteint très rapidement. Pendant les 15 premières minutes, 50 % de la CIP est libérée dans le milieu pour ces deux ratios. Les éponges 3:3 TT sont celles qui libèrent la CIP le plus rapidement (4 heures) comparativement aux éponges 3:1 TT (10 heures). Les éponges 3:0 TT présentent quant à elles un profil de libération prolongé pendant 24 heures. Ces éponges montrent une libération de 50% de la CIP en 12 h, alors qu'elle était de 15 minutes pour les éponges contenant le PCD. L'augmentation de PCD dans la formulation tend donc à accélérer la vitesse de libération de la CIP. Comme nous l'avons expliqué précédemment, la CIP sous sa forme zwitterion interagit avec les groupes NH_3^+ libres du CHT.

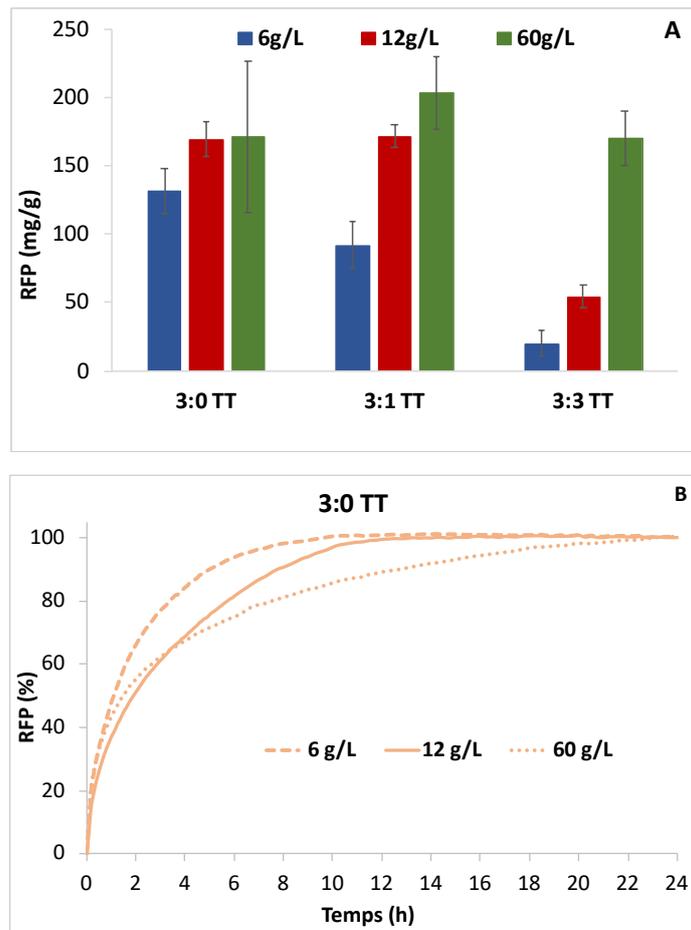
L'ajout de PCD entraîne une diminution du nombre de ces groupements libres qui forment des interactions ioniques avec les groupements carboxylates. L'absorption de la CIP pourrait donc avoir une influence sur la vitesse de libération de l'ATB. Plus elle est importante plus la libération sera ralentie et inversement, une sa diminution pourrait engendrer une libération plus rapide.

L'équipe de Wells et al. a étudié la libération de CIP après imprégnation d'éponges à base de CHT, de CHT/polyéthylène glycol obtenues par lyophilisation, et d'une éponge modèle commercial (Sentrex Biosponge™). Après une libération en condition statique dans une solution de PBS, ils ont montré une amélioration de la quantité d'ATB absorbée par les dispositifs contenant du CHT. Les profils de libération obtenus présentaient un effet *burst* la première journée puis une libération prolongée jusqu'à 7 jours (247). Bien que le procédé de fabrication de leur dispositif soit similaire au nôtre, la cinétique de libération de la CIP par les éponges de CHT est différente. Elle peut être expliquée par la différence des conditions opératoires. Le mode dynamique avec lequel nous avons travaillé entraîne une libération plus rapide des principes actifs en raison du flux continu.

En conclusion, les formulations contenant le moins de PCD montrent les absorptions de CIP les plus importantes, et les cinétiques de libération les plus lentes. Ces résultats confirment la formation d'interactions ioniques préférentielles de la CIP avec la CHT et montrent que nous pouvons moduler la libération du principe actif en fonction de la quantité de PCD dans la formulation.

2.2. Étude de la libération de la rifampicine

La RFP est une poudre lyophilisée à reconstituer, dont il est facile de faire varier sa concentration. Nous avons choisi de travailler avec des concentrations de 6 g/L, 12 g/L (concentration hospitalière) et 60 g/L afin d'étudier leurs impacts de la concentration de RFP sur la capacité d'absorption des éponges et leur profil de libération. L'étude de la libération a été menée en mode dynamique avec les mêmes paramètres que pour l'étude de la CIP. Les quantités de RFP libérées au bout de 24 heures et leurs profils de libération sont présentés Figure 55.



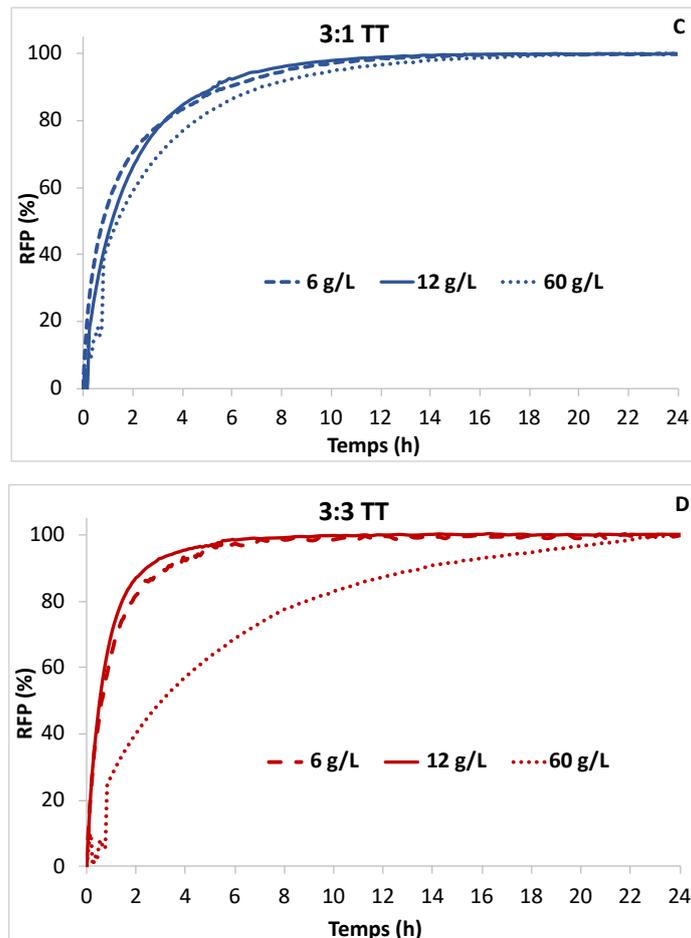


Figure 55 : Quantité de RFP absorbée après 4 h (A) et profils de libération des éponges 3:0 TT (B), 3:1 TT (C) et 3:3 TT (D) après imprégnation à 6, 12 et 60 g/L et libération en conditions dynamiques (Sotax UPS4, 37°C, 5 mL/min) dans une solution de PBS à pH 7,4. N=6 échantillons

La Figure 55 A montre la quantité de RFP libérée après 24 h dans la solution de PBS en fonction de la formulation CHT:PCD et de la concentration de la solution d'imprégnation de RFP. Quelle que soit la formulation de l'éponge, lorsque la concentration de la solution d'imprégnation augmente, la quantité de RFP libérée après 24 heures augmente notamment pour les éponges contenant du PCD. La formulation 3:3 TT absorbe par exemple 20 ± 9 mg/g, 54 ± 8 mg/g et 171 ± 20 mg/g aux concentrations respectives de 6, 12 et 60 g/L. Cette augmentation est toutefois moins visible pour le ratio 3:0 TT (132 ± 17 mg/g, 169 ± 12 mg/g et 171 ± 56 mg/g). En revanche, lorsque les éponges sont imprégnées dans une solution à 60 g/L, aucune différence significative n'est constatée entre les différents ratios ($p > 0,05$). Lorsqu'une faible concentration d'imprégnation est utilisée, la RFP sous sa forme zwitterion interagit préférentiellement avec le CHT, entraînant une absorption maximale pour les

éponges 3:0 TT. L'absorption diminue avec l'ajout de PCD dans la formulation par consommation des groupements amines libres. Néanmoins, on observe avec l'augmentation de la concentration d'imprégnation une hausse de la quantité absorbée par les éponges 3:1 TT et 3:3 TT suggérant une inclusion de la RFP dans la CD. A partir d'une concentration critique (12 g/L pour le ratio 3:1 TT et 60 g/L pour le ratio 3:3 TT), cette inclusion permet de compenser la perte d'absorption de l'ATB par le CHT. À fortes concentrations, la RFP, en interaction avec le CHT, pourrait interagir avec elle-même en s'auto assemblant entraînant une augmentation de l'absorption

La Figure 55 B illustre les cinétiques de libération de la RFP en fonction du ratio et de la concentration d'imprégnation au cours du temps. Tous les échantillons montrent le même profil avec un effet *burst* initial pendant les premières heures avant d'atteindre progressivement un plateau. La vitesse de la libération est en revanche influencée par la concentration d'imprégnation. En effet, plus elle est importante plus la libération est lente. Ce phénomène est particulièrement visible pour les ratios 3:0 TT et 3:3 TT. On constate que pour les éponges contrôles 3:0 TT, 80 % de la RFP absorbée est libérée en 3, 6 et 8 h respectivement pour les concentrations de 6, 12 et 60 g/L. L'effet *burst* est donc diminué avec l'augmentation de la concentration de la solution d'imprégnation, et la totalité de la RFP est libérée plus lentement (plateau à 9 h, 12 h et 23 h pour les concentrations respectives de 6, 12 et 60 g/L). Concernant les éponges 3:3 TT, la cinétique de libération est particulièrement diminuée pour de hautes concentrations d'imprégnation. On observe qu'après seulement 2 h, 80 % de la RFP est libérée pour les concentrations de 6 et 12 g/L, contre 40 % à 60 g/L. Les plateaux sont ensuite atteints dès la 8^{ème} heure pour les plus faibles concentrations, et 18 h plus tard pour une solution très concentrée à 60 g/L. On constate donc un effet concentration-dépendant qui ralentit la vitesse de libération de l'ATB. Cet effet concentration-dépendant pourrait être régi par deux mécanismes : 1) la capacité des molécules de RFP à interagir avec elle-même entraînant une libération plus lente et 2) un mécanisme de contrôle de la libération grâce à l'inclusion hôte/invité dans la CD pour des concentrations d'imprégnation élevées.

3. Conclusion

L'étude des libérations de la CIP a montré que le gonflement, mais surtout les interactions des ATBs avec le CHT influencent la capacité d'absorption des éponges en fonction du ratio. La CIP et la RFP sous leur forme zwitterion interagissent préférentiellement avec le CHT via ses groupements amines protonés. Le nombre de ces charges ionisées libres diminue avec l'augmentation de la quantité de PCD dans la formulation. Il existe donc une compétition entre les interactions CHT/PCD qui stabilisent l'hydrogel, et les interactions ATB/CHT qui entraînent une diminution de l'absorption des principes actifs en fonction de la proportion de PCD. Il a aussi été constaté que plus la quantité absorbée est importante plus la libération est lente. L'inclusion dans la CD n'est donc pas responsable de la libération contrôlée. Il est important de rappeler que le PCD apporte une meilleure stabilité du système en milieu aqueux et une amélioration de la compatibilité de l'éponge pour l'application clinique visée en termes de propriétés mécaniques. Nous avons constaté que dépourvu de PCD le dispositif ne répond pas au cahier des charges.

L'objectif de cette thèse est de développer un dispositif médical qui libère localement et de manière prolongée des ATBs directement sur le site infecté (plaies infectées du pied chez le patient diabétique). Ces éponges seront donc un dispositif médical antibactérien dont il est nécessaire d'évaluer l'activité sur les bactéries. Une étude microbiologique a ainsi été réalisée afin de déterminer si elles sont compatibles avec l'indication visée. Cette étude constitue la troisième partie des résultats de ce travail.

Partie 3 : Étude in vitro de l'activité des éponges chargées d'antibiotiques

Dans un premier temps, l'évaluation de l'activité antibactérienne des éponges a été réalisée par des tests de diffusion. Ces tests permettent de mesurer la capacité des éponges à libérer une quantité suffisante d'antibiotiques pour inhiber la croissance bactérienne. Des tests de *Kill Time* ont ensuite été réalisés pour évaluer la cinétique de réduction bactérienne, lorsque les bactéries sont mises au contact des éponges imprégnées. Comme décrit précédemment, les bactéries le plus souvent isolées dans les DFIs sont *S. aureus* et *E. coli*. Les essais seront donc réalisés sur ces deux pathogènes.

3.1. Test de diffusion

3.1.1. Éponges chargées avec la ciprofloxacine

Pour réaliser le test de diffusion nous avons dans un premier temps procédé à une libération statique, dite « en batch », des éponges imprégnées d'ATB (2 g/L, 4 h, 37 °C) dans une solution de PBS pH 7,4. À intervalles de temps réguliers, le milieu est prélevé et renouvelé. Ce milieu collecté est réservé et injecté dans des puits creusés dans les géloses MHA préalablementensemencées de *S. aureus* et *E. coli*. Si ce milieu possède une activité antibactérienne, des cercles d'inhibition de la prolifération bactérienne se formeront autour de la zone de dépôt après une incubation de 24 h à 37 °C. Le diamètre des cercles est proportionnel à la quantité de CIP libérée dans le milieu. Les résultats sont présentés Figure 56.

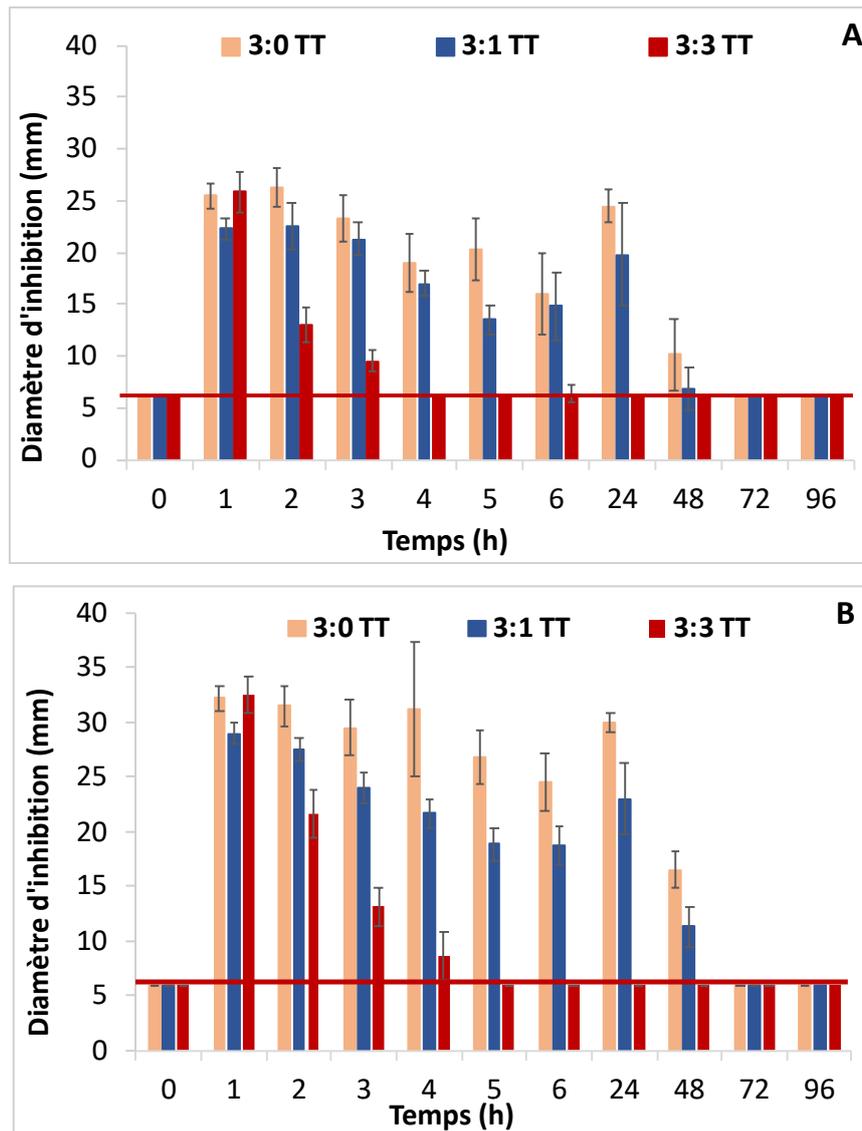


Figure 56 : Diamètres d'inhibition mesurés après dépôt des milieux de libération provenant des éponges 3:0 TT, 3:1 TT et 3:3 TT sur des géloses ensemencées de *S. aureus* (A) et d'*E. coli* (B). N=6 échantillons

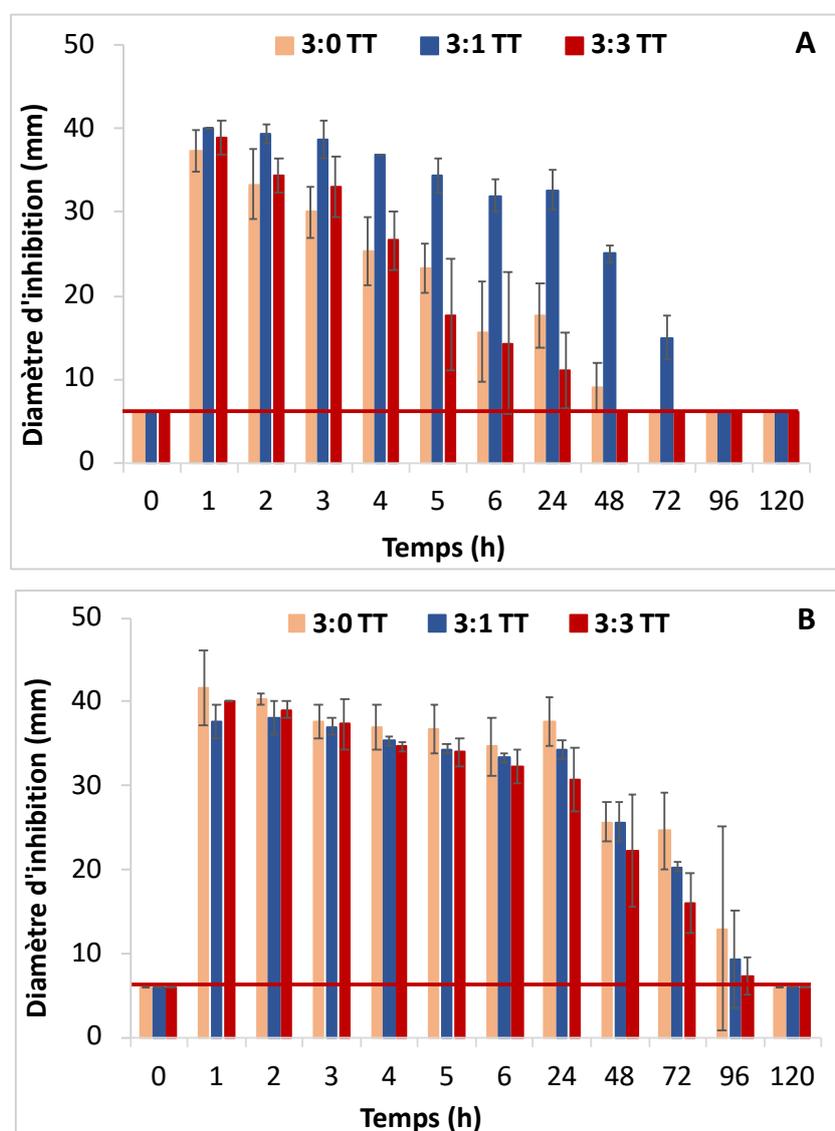
La Figure 56 montre que l'activité antibactérienne des milieux de libération diminue au cours du temps quels que soient la souche et l'échantillon testés. Ces résultats sont directement liés à la quantité de CIP mesurée dans les milieux de libération. L'activité antibactérienne est prolongée jusqu'à 48 h pour les ratios 3:0 TT et 3:1 TT sur *S. aureus* et *E. coli*. En revanche, pour le ratio 3:3 TT les cercles d'inhibition ne sont visibles que pendant les premières heures de la libération (3 h sur *S. aureus* et 4 h sur *E. coli*). En terme de taille de diamètres d'inhibition, les éponges 3:0 TT présentent des diamètres plus importants que ceux du ratio 3:1 TT, quand bien même la durée de l'activité antibactérienne est la même sur les deux souches (48 heures). Au bout de 48 heures de libération, les diamètres d'inhibition sont

de 10 ± 3 mm et 6 ± 2 mm pour les échantillons 3:0 TT et 3:1 TT sur *S. aureus* et de 17 ± 2 mm et 11 ± 2 mm sur *E. coli*. Ces observations suggèrent qu'il existe une corrélation entre la quantité de principe actif absorbée et le profil de l'inhibition bactérienne. La capacité d'absorption et l'activité antibactérienne sont les plus importantes pour le ratio 3:0 TT. Le chargement de l'éponge semble donc avoir une influence sur le profil de libération des antibiotiques et sur la durée de son activité antibactérienne.

On constate également que l'activité des milieux de libération (à concentrations identiques) est plus importante sur *E. coli* que sur *S. aureus*. Les résultats de l'évaluation de la CMI ont révélé des concentrations de 0,25 mg/L sur *S. aureus* et 0,125 mg/L sur *E. coli*. En effet, les bactéries à Gram- sont plus sensibles à la CIP que les bactéries à Gram+ (302). Cette différence de sensibilité reposerait entre autre sur la capacité d'une molécule à pénétrer dans la bactérie (303). *E. coli* porte sur sa membrane externe des porines (pores de transports) qui pourraient faciliter la pénétration de la CIP (304). Des études montrent la corrélation entre le caractère hydrophobe/hydrophile d'une molécule et sa pénétration à travers la paroi bactérienne. Sharma et *al.* ont montré une meilleure diffusion de la CIP HCl (hydrophile) à travers la membrane d'*E. coli* (305). Il est admis que plus un composé est hydrophile, meilleure est sa pénétration au sein des pathogènes (306). De plus, cette fluoroquinolone est la plus puissante contre les bactéries Gram- (307). En effet, elle dérive de l'acide nalidixique et possède un cycle à six chaînons et un groupement N-cyclopropane qui entraînent une activité prolongée sur les Gram-, une meilleur biodisponibilité et pénétration tissulaire, ainsi qu'une demi-vie plasmatique plus longue (308). Les bactéries possèdent deux types de topoisomérases, l'ADN gyrase et la topoisomérase IV. L'analyse des mécanismes de résistance d'*E. coli* a montré que l'ADN gyrase est la principale cible des quinolones, et la topoisomérase IV la seconde. Cette préférence varie en fonction de l'espèce pathogène et de la molécule d'ATB (309). Le mécanisme d'action moléculaire repose sur la capacité des fluoroquinolones à s'insérer entre les deux sous-unités de l'ADN gyrase (GyrA et GyrB) et de la topoisomérase IV (ParC et ParE). L'ATB s'insère et se lie aux enzymes de manière covalente par le carbone 7 (portant le groupement pipérazine) de son cycle aromatique, et par son groupement carboxyle en position 3 (310).

3.1.2. Éponges chargées avec la rifampicine

L'activité antibactérienne des éponges RFP est évaluée selon le même procédé que pour les éponges CIP. Après une libération statique de la RFP, à différents temps, dans du PBS, celui-ci est collecté et déposé sur des géloses de MHA, préalablementensemencées de bactéries. Les éponges ont été imprégnées dans des solutions de RFP à 12 et 60 g/L (4h, 37 °C) pour évaluer l'impact de la concentration d'imprégnation sur l'inhibition de la croissance bactérienne. L'évolution des cercles d'inhibition formés au cours du temps est illustrée Figure 57.



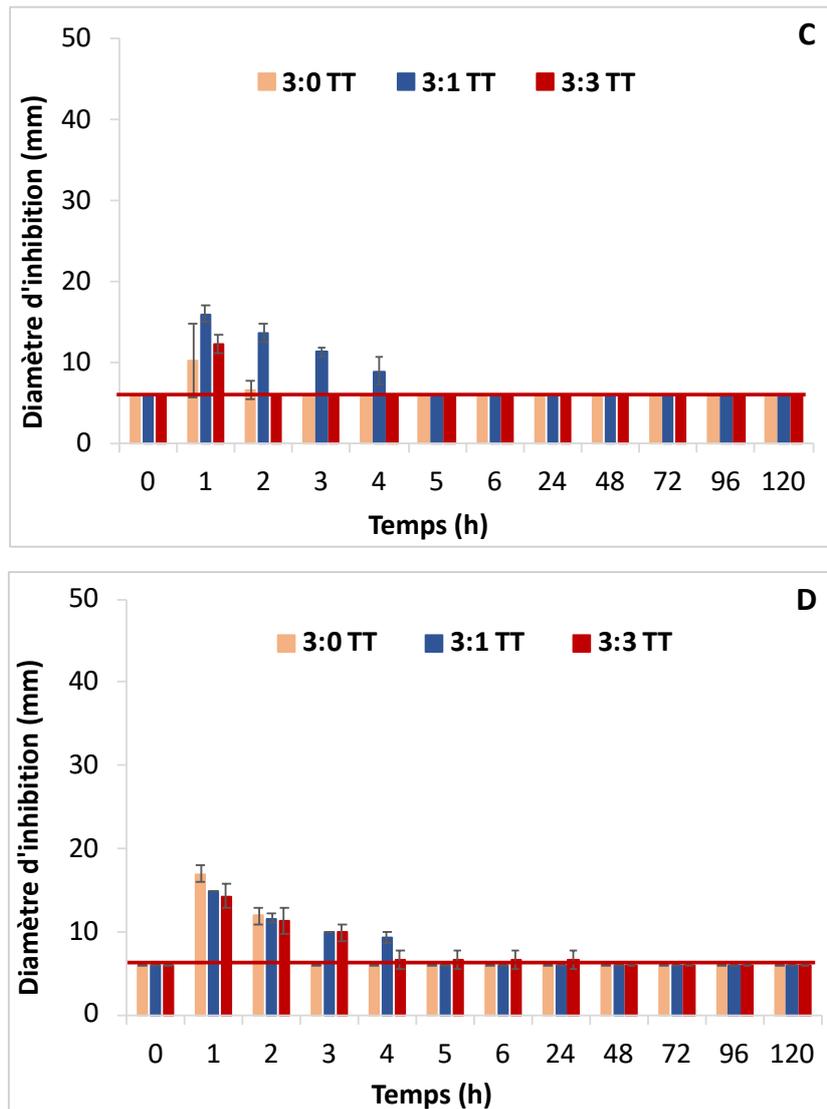


Figure 57 : Diamètre d'inhibition mesurés après dépôt des milieux de libération provenant des éponges RFP 3:0 TT, 3:1 TT et 3:3 TT imprégnées à 12 g/L (A) et 60 g/L (B) sur des géloses de MHAensemencées de *Staphylococcus aureus* ; et imprégnées à 12 g/L (C) et 60 g/L (D) sur des géloses de MHAensemencées d'*Escherichia coli*. N=3 échantillons

La Figure 57 A montre les résultats du test de diffusion sur *S.aureus* des éponges imprégnées dans une solution de RFP à une concentration de 12 g/L. Une activité antibactérienne est observée jusqu'à 48, 72 et 24 h respectivement pour les ratios 3:0 TT, 3:1 TT et 3:3 TT. Les éponges 3:1 TT présentent l'activité antibactérienne la plus prolongée. Ce résultat est surprenant car nous avons observé dans la partie 2 2.2. (page 117) que pour une solution d'imprégnation à 12 g/L les profils de libération étaient accélérés avec l'ajout de PCD dans la formulation. La reproductibilité de la méthode de fabrication des éponges peut être

remise en cause. Comme nous l'avons vu, il existe une variabilité inter lots qui influence la capacité d'absorption et de libération des éponges.

Pour une concentration de RFP à 60 g/L (Figure 57 B), une activité sur *S. aureus* est observée jusqu'à 72 h pour tous les dispositifs sans différence significative. Il est important de rappeler que dans la partie absorption (partie 2 2.2. page 117), il avait été noté une absorption de RFP, sans différence significative, de rifampicine quelle que soit la formulation (3:0 TT : 172 ± 56 mg/g, 3:1 TT : 203 ± 27 mg/g et 3:3 TT : 171 ± 20 mg/g) lorsque les éponges étaient imprégnées dans une solution de RFP à 60g/L. Pour cette même concentration, la vitesse de libération notamment du ratio 3:3 TT était ralentie. Toutefois, tous les ratios montrent le même profil d'activité antibactérienne lorsqu'ils sont imprégnés à 60 g/L.

Sur *E.coli* ((Figure 57 C et D) les éponges chargées avec la RFP possèdent une activité antibactérienne très faible qu'elles aient été imprégnées dans une solution d'ATB à 12 ou 60 g/L. L'intensité (diamètre du cercle d'inhibition) de cette activité est 2 fois moins importante que sur *S.aureus*, et la croissance des bactéries n'est inhibée que jusqu'à 4 h. Le ratio 3:1 TT montre une nouvelle fois le meilleur pouvoir antibactérien. Cette différence d'activité s'explique par la valeur de la CMI qui est bien plus élevée pour *S. aureus* ($< 0,03$ mg/L) que pour *E. coli* (> 64 mg/L). La RFP est en effet un ATB connu pour être plus actif sur les Gram+ que sur les Gram-. William et *al.* ont montré qu'à concentration égale en RFP exogène, *E. coli* présente une concentration intracellulaire en ATB 3 fois moins importante que celle accumulée chez *S. aureus* (311). La membrane externe d'*E. coli* se comporterait comme une barrière à la RFP, empêchant le médicament d'entrer dans la cellule. A ce phénomène pourrait être associé un mécanisme d'efflux actif. Des études sur des souches d'*E. coli* mutantes suggèrent que la RFP est un substrat pour les pompes à efflux de la bactérie (312). Le mécanisme d'action de cet ATB repose sur sa capacité à se lier de façon stable à l'ARN polymérase bactérienne qui est constituée du « core enzyme » catalytique (4 sous-unités : α , β , β' et ω) associé à une sous-unité σ assurant la reconnaissance des promoteurs. Les rifamycines se lient à l'enzyme de translocation par la sous-unité β via des liaisons hydrogènes et des interactions de Van der Waals (313)(314). Des CMI élevées pour les bactéries Gram- ne sont pas dues à une ARN polymérase moins sensible, mais à une pénétration réduite de la rifampicine à travers la membrane externe de ces organismes (303). Il est donc essentiel dans des infections polymicrobiennes d'associer la rifampicine à un ATB possédant un spectre

d'activité antimicrobienne sur les Gram-. Les éponges CIP ont montré de bons résultats de microbiologie sur *E.coli*. Cette fluoroquinolone est particulièrement active sur les bactéries Gram- (315). L'association des molécules de CIP et de RFP permettra une action complète sur un large spectre bactérien et évitera les sélections de résistances.

A l'issue de ce test nous avons décidé de continuer à ne travailler qu'avec une concentration d'imprégnation de 12 g/L. Cette concentration est habituellement utilisée en milieu hospitalier et sera donc la plus représentative de l'activité antibactérienne des éponges chargées.

3.1.3. Éponges chargées avec l'association ciprofloxacine-rifampicine

Pour avoir une action complète sur toutes les bactéries, il est nécessaire d'associer la RFP à un ATB ayant un spectre dirigé contre les Gram-. La CIP possède une bonne activité sur ces pathogènes, et il a été montré que les éponges avec la CIP sont efficaces sur *E. coli* (et sur *S. aureus*). Un test de diffusion après une libération en condition statique a été réalisé pour évaluer l'activité antibactérienne des éponges lorsque les deux ATBs sont associés. Les échantillons ont été testés sur *S. aureus* et sur *E. coli* dans les mêmes conditions que les éponges imprégnées uniquement de CIP ou de RFP. La Figure 58 présente les évolutions du diamètre d'inhibition en fonction du temps de séjour dans la solution de PBS des éponges imprégnées des deux ATBs sur *S. aureus* (Figure 58 A) et *E. coli* (Figure 58 B).

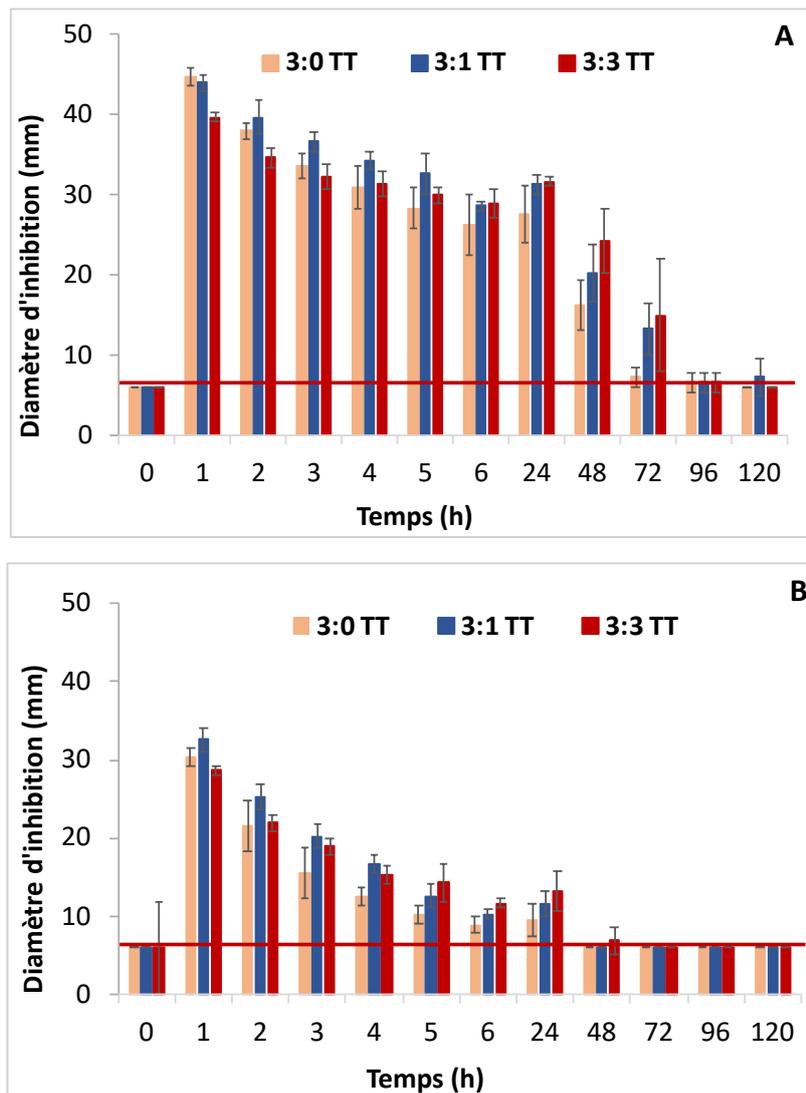


Figure 58 : Diamètres d'inhibition mesurés après dépôt des milieux de libération provenant des éponges 3:0 TT, 3:1 TT et 3:3 TT, imprégnées de CIP et de RFP, sur *S. aureus* (A) et *E. coli* (B) (libération statique de 5 jours). N=3 échantillons

La Figure 58 montre une inhibition prolongée de la prolifération sur *S. aureus* jusqu'à 48 h pour le ratio 3:0 TT et jusqu'à 72 h pour les ratios 3:1 TT et 3:3 TT. L'activité antibactérienne sur *S. aureus* est plus importante avec les éponges chargées avec les deux principes actifs que celles des systèmes chargés avec un seul ATB (Tableau 16) notamment pour les éponges contenant le PCD. On peut supposer une synergie d'action des deux antibiotiques. La synergie résulte d'une interaction positive entre deux antibiotiques dont l'action antibactérienne conjointe est supérieure à la somme des actions de chacun des deux antibiotiques pris isolément (316). La synergie d'action de ces deux ATBs n'est pas décrite dans la littérature. En revanche, une méta-analyse des traitements ATBs utilisés dans les infections de l'os, menée

par Stengel et *al.*, a montré que le contrôle durable des infections à *S. aureus* tend à être amélioré lors d'une association CIP-RFP comparativement à l'utilisation des ATBs en monothérapie (317).

L'activité antibactérienne sur *E. coli* n'est observée que jusqu'à 24 h sans différence significative entre les différents ratios. Nous avons pu constater une inhibition de la croissance du pathogène jusqu'à 48 h (3:0TT et 3:1 TT) lorsque les éponges étaient chargées uniquement avec la CIP, et jusqu'à 4 h pour celles imprégnées de RFP (3:1 TT) (Tableau 16). Pour *E.coli* l'activité antibactérienne de l'association est donc plus importante que celle des éponges chargée de RFP seule, mais diminuée par rapport à celles imprégnées de CIP. L'association des deux ATBs diminue donc les effets antibactériens de la fluoroquinolone sur *E. coli*. Les deux molécules sont chargées négativement et forment des liaisons électrostatiques avec les groupements NH_3^+ libres du CHT. On peut supposer qu'une plus grande quantité de RFP est absorbée par l'éponge car il existe un mécanisme de compétition des ATBs sur les sites d'interaction. Cette compétition diminue le nombre de molécules de CIP absorbées par l'éponge ce qui engendre une moins bonne activité sur les Gram-. Ce phénomène a déjà été observé au laboratoire lors du chargement d'une prothèse vasculaire fonctionnalisée avec la CD et chargées de l'association de ces deux ATBs (résultats en cours de publication). Un dosage des ATBs dans le milieu de libération confirmera cette hypothèse. La molécule de RFP absorbe à la même longueur d'onde que la CIP (270 nm). Il est donc très difficile de doser ces deux composés lorsqu'ils sont associés. Une méthode de dosage par HPLC UV (chromatographie liquide haute performance) pour séparer les deux antibiotiques est en cours de mise en place au laboratoire.

Tableau 16 : Activité antibactérienne maximale observée sur *S. aureus* et *E. coli*, en fonction du ratio et de l'antibiotique

	<i>S. aureus</i>			<i>E. coli</i>		
	CIP	RFP	CIP-RFP	CIP	RFP	CIP-RFP
3:0 TT	48 h	48 h	48 h	48 h	1 h	24 h
3:1 TT	24 h	72 h	72 h	48 h	4 h	24 h
3:3 TT	3 h	24 h	72 h	4 h	1 h	24 h

3.2. Test de la réduction bactérienne (*Kill Time*)

3.2.1. Éponges chargées avec ciprofloxacine

Le test du *Kill Time* permet d'évaluer la capacité d'un échantillon à induire une réduction bactérienne. Il quantifie le nombre de bactéries viables (UFC/échantillon) sur un échantillon en fonction du temps de contact et à partir d'une charge bactérienne initiale. Les cinétiques de réduction bactériennes des éponges 3:0, 3:1 et 3:3 réticulées ont été réalisées en présence des deux pathogènes. La Figure 59 montre la réduction bactérienne (UFC/échantillon) de *S. aureus* (Figure 59 A) et *E. coli* (Figure 59 B) après une mise en contact avec les éponges réticulées des différents ratios imprégnées ou non de CIP (2 g/L, 4 h à 37 °C).

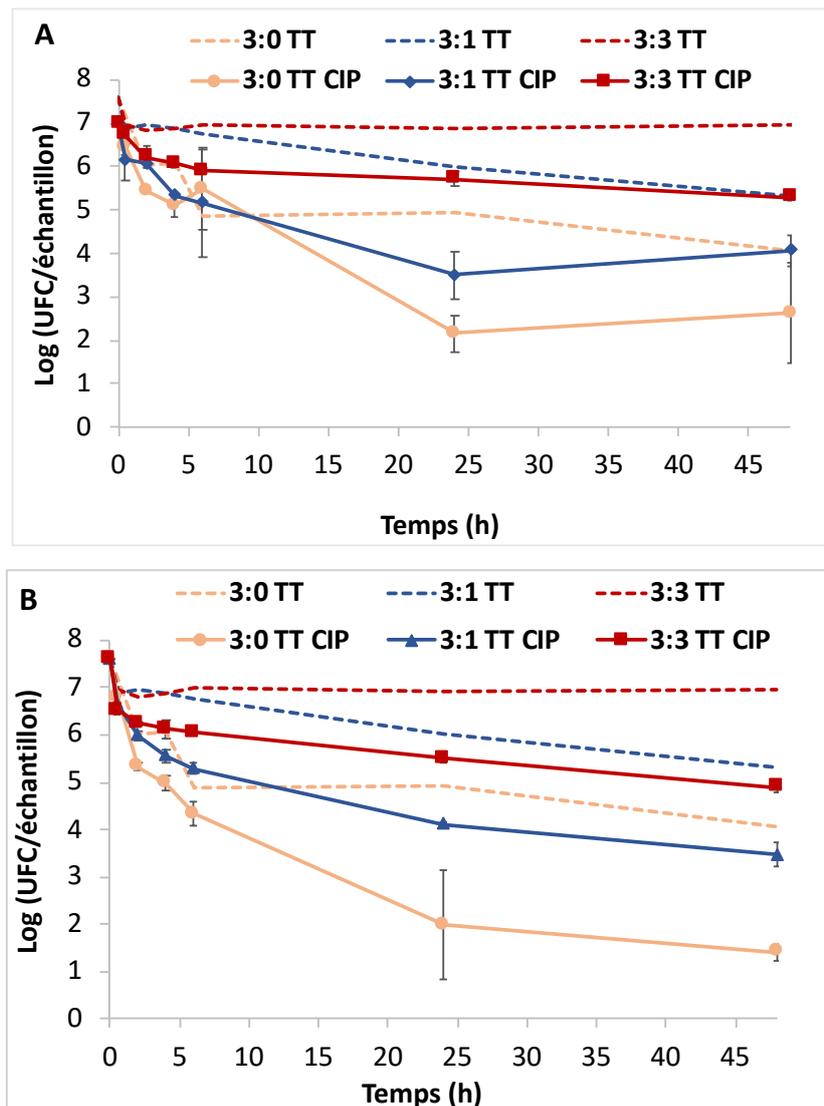


Figure 59 : Cinétique de la réduction bactérienne en fonction du temps et des différents ratios 3:0, 3:1 et 3:3 témoins (TT) ne contenant pas d'antibiotique et imprégnés de CIP (TT CIP) sur les souches de *S. aureus* (A) et d'*E. coli* (B). N=3 échantillons

La Figure 59 et le Tableau 17 montrent que le nombre de colonies de *S. aureus* viables après 6 h de contact avec les éponges témoins non imprégnées de CIP est réduit de 3 Log₁₀ pour les ratios 3:0 TT, 3:1 TT et de 1 Log₁₀ pour le ratio 3:3 TT. La réduction bactérienne se stabilise ensuite à 2 Log₁₀ pour les éponges 3:0 TT et 1 Log₁₀ pour les éponges 3:1 TT et 3:3 TT.

La réduction bactérienne des éponges non imprégnées est moins importante sur *E. coli* que sur *S. aureus* au bout de 6 heures (3:0 TT : 2,7 Log₁₀, 3:1 TT et 3:3 TT : 1 Log₁₀). En revanche, elle continue de diminuer pour atteindre 3,5 Log₁₀ et 2,3 Log₁₀ pour les ratio 3:0 et 3:1 TT respectivement après 48 h.

L'activité antibactérienne des éponges non imprégnées observée est liée aux propriétés intrinsèques du CHT. Un des mécanismes responsables de la mort des bactéries est la formation d'interactions électrostatiques entre les groupes amines protonés du CHT et les éléments chargés négativement de la paroi des pathogènes. L'acide lipotéichoïque confère à la paroi des bactéries Gram+ un caractère anionique par apport d'ions phosphates. Les lipopolysaccharides de la membrane des Gram- sont, quant à eux responsables de la polarisation de cette dernière (318)(319). Comme nous l'avons vu dans la partie absorption (partie 2 1.2.1. page 105), la présence du PCD consomme les de groupes amines libres par formation d'interactions ioniques. Les fonctions amines ainsi consommées ne peuvent plus interagir avec les bactéries, ce qui entraîne une diminution de l'activité bactérienne des éponges contenant du PCD. Il existe des études controversées sur la différence de sensibilité des bactéries Gram+ et Gram- au CHT. Des auteurs ont démontré que le CHT avait une activité plus importante sur *E. coli* que sur *S. aureus* (320)(321). L'épaisseur de la paroi de la bactérie pourrait jouer un rôle dans cette différence de sensibilité. La paroi cellulaire d'*E. coli* est de l'ordre de 7-8 nm, alors que celle de *S. aureus* est de 20-80 nm ce qui entraîne une meilleure protection contre la lyse (322). Cependant, il existe des études contradictoires ayant montré une plus grande activité du CHT sur les Gram+ que sur les Gram- (323)(324).

Tableau 17 : Réduction bactérienne de *S. aureus* et *E. coli* après 6 h et 48 h de mise au contact des échantillons non imprégnés 3:0 TT, 3:1 TT et 3:3 TT et imprégnés de CIP 3:0 TT CIP, 3:1 TT CIP et 3:3 TT CIP

	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	6 h	48 h	6 h	48 h
3:0 TT	3 Log ₁₀	2 Log ₁₀	2,7 Log ₁₀	3,5 Log ₁₀
3:1 TT	3 Log ₁₀	1 Log ₁₀	1 Log ₁₀	2,3 Log ₁₀
3:0 TT CIP	3,5 Log ₁₀	5 Log ₁₀	3,3 Log ₁₀	6,2 Log ₁₀
3:1 TT CIP	3 Log ₁₀	3,5 Log ₁₀	2,3 Log ₁₀	4 Log ₁₀
3:3 TT CIP	1 Log ₁₀	1,5 Log ₁₀	1,6 Log ₁₀	2,7 Log ₁₀

Lorsque les éponges sont chargées avec la CIP, l'activité antibactérienne est nettement améliorée. Les ratios 3:0 TT CIP, 3:1 TT CIP et 3:3 TT CIP montrent une réduction bactérienne

sur *S. aureus* (Figure 59 A) de 3,5 Log₁₀, 3 Log₁₀ et 1 Log₁₀ respectivement après 6 h de contact. Elle atteint un maximum à 24 h de 5 Log₁₀ (3:0 TT CIP), 3,5 Log₁₀ (3:1 TT CIP) et 1,5 Log₁₀ (3:3 TT CIP). On peut noter que la cinétique de réduction bactérienne des éponges 3:0 TT CIP et 3:1 TT CIP est bien plus rapide que celle du ratio 3:3 TT CIP. Après le point 24 h on observe une reprise progressive de la prolifération. L'ensemble de ces observations est résumé Tableau 17.

Sur *E. coli* (Figure 59 B) le nombre de bactéries est réduit de 3,3 Log₁₀, 2,3 Log₁₀ et 1,6 Log₁₀ après 6 h respectivement pour les ratio 3:0 TT CIP, 3:1 TT CIP et 3:3 TT CIP. La réduction bactérienne est prolongée jusqu'à 48 h à 6,2 Log₁₀ (3:0 TT CIP), 4 Log₁₀ (3:1 TT CIP) et 2,7 Log₁₀ (3:3 TT CIP). Le nombre de colonies diminue donc de manière plus importante et plus rapide lorsque la bactérie est au contact des éponges 3:0 TT imprégnée de CIP. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus au cours des tests de libération et du test de diffusion. La quantité de CIP absorbée par l'éponge diminue avec l'ajout de PCD dans la formulation. On observe une réduction bactérienne moins importante lorsque les bactéries sont mises au contact des dispositifs contenant du PCD car la quantité de CIP absorbée est diminuée. Les éponges 3:3 TT CIP sont donc les moins performantes en terme de réduction du nombre de bactéries.

L'effet bactéricide est caractérisé par une décroissance continue de la population bactérienne au cours du temps. À l'inverse, une activité bactériostatique se traduit par une réduction puis une reprise de la prolifération bactérienne. L'effet bactéricide des éponges est ainsi mis en évidence sur *E. coli* et *S. aureus*. La légère reprise de la croissance observée sur la bactérie Gram+ est négligeable. Cette reprise de la croissance peut s'expliquer par une concentration en ATB devenant insuffisante pour la population bactérienne (moins sensible que les Gram-).

3.2.2. Éponges chargées avec la rifampicine

Les tests de *Kill Time* ont été réalisés avec des éponges imprégnées dans une solution de RFP à une concentration de 12 g/L pendant 4 h. La Figure 60 présente la réduction du nombre de colonies viables au cours du temps, au contact des dispositifs témoins sans ATB et imprégnés en RFP sur *S. aureus* (Figure 60 A) et *E. coli* (Figure 60 B).

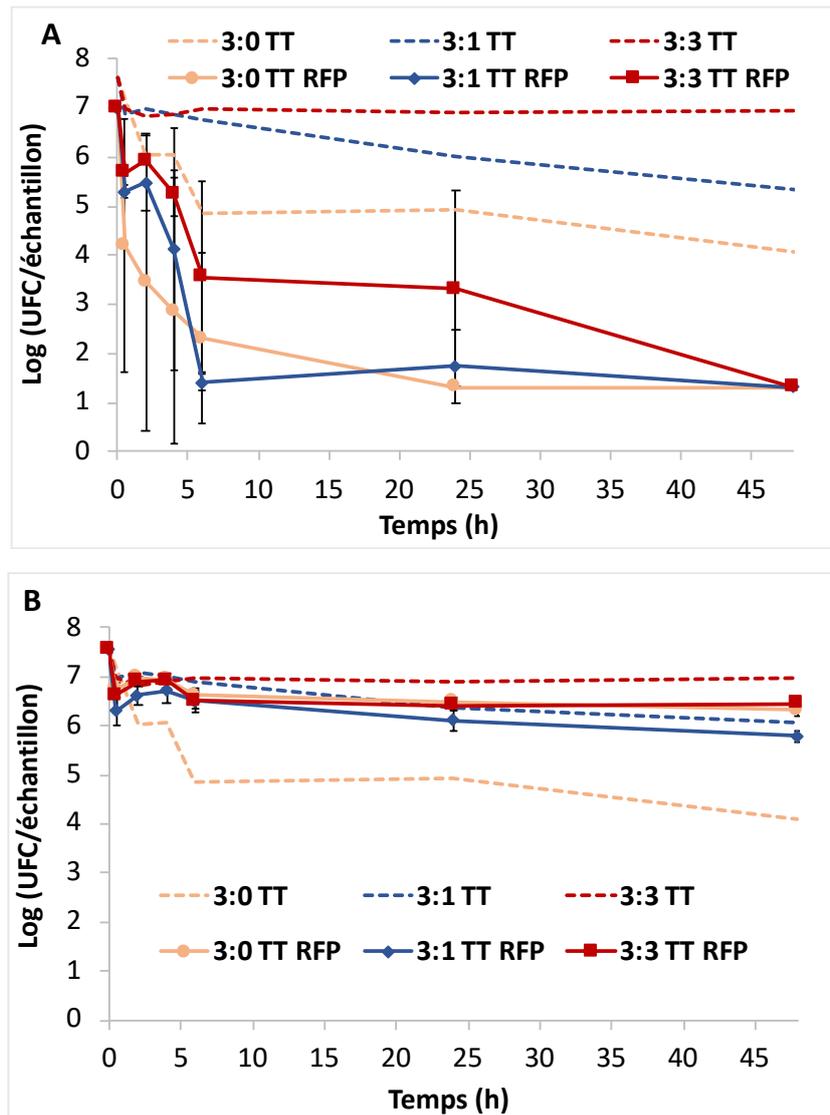


Figure 60 : Cinétique de la réduction bactérienne en fonction du temps et des différents ratios 3:0, 3:1 et 3:3 témoins (TT) ne contenant pas d'antibiotique et imprégnés de RFP (TT RFP) sur les souches de *Staphylococcus aureus* (A) et d'*Escherichia coli* (B). N=3 échantillons

La Figure 60 A montre qu'après imprégnation des éponges dans la RFP un effet antibactérien sur *S. aureus* amélioré est observé comparativement aux témoins. La décroissance bactérienne est très rapide avec à 6 h une réduction du nombre de colonies de 5,7 Log₁₀, 6,6 Log₁₀ et 4,4 Log₁₀ respectivement pour les ratios 3:0 TT RFP, 3:1 TT RFP et 3:3 TT RFP après 6 heures de contact. La décroissance continue progressivement jusqu'à 48 h pour atteindre une diminution de 6,7 Log₁₀. Il faut noter que les analyses statistiques n'ont pas mis en évidence de différence significative entre les différents ratios après 24 heures au contact de *S. aureus* (p > 0,05).

L'activité observée sur *E. coli* (Figure 60 B) est en revanche très faible avec une diminution du nombre de colonies de 1,1 Log₁₀ après 6 h et qui se stabilise ensuite. Les échantillons imprégnés de RFP ne montrent pas d'activité antibactérienne sur *E. coli* comparativement à l'éponge contrôle 3:0 TT dont l'activité antibactérienne a été attribuée aux propriétés intrinsèques du CHT. Après imprégnation, ces groupements sont consommés dans des interactions ioniques avec l'ATB, qui est très peu actif sur les bactéries Gram-. L'ensemble des résultats est résumé Tableau 18.

Ces résultats mettent en évidence l'effet bactéricide des éponges imprégnées de RFP sur *S. aureus*. Son activité est en revanche très faible sur *E. coli* d'où la nécessité de l'utiliser en association dans les infections polymicrobiennes telles que celles des DFIs.

Tableau 18 : Réduction bactérienne de *S. aureus* et *E. coli* après 6 h et 48 h de mise au contact des échantillons imprégnés de RFP

	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	6 h	48 h	6 h	48 h
3 :0 TT RFP	5,7 Log ₁₀	6,7 Log ₁₀	1,1 Log ₁₀	1,1 Log ₁₀
3 :1 TT RFP	6,6 Log ₁₀	6,7 Log ₁₀	1,1 Log ₁₀	1,1 Log ₁₀
3 :3 TT RFP	4,4 Log ₁₀	6,7 Log ₁₀	1,1 Log ₁₀	1,1 Log ₁₀

3.2.3. Éponges chargées avec l'association de ciprofloxacine/rifampicine

Les cinétiques de réduction bactérienne de *S. aureus* et d'*E. coli* ont été évaluées par un test du *Kill Time* après avoir mis les bactéries au contact des éponges chargées des deux ATBs (CIP-RFP). Les résultats sont présentés Figure 61.

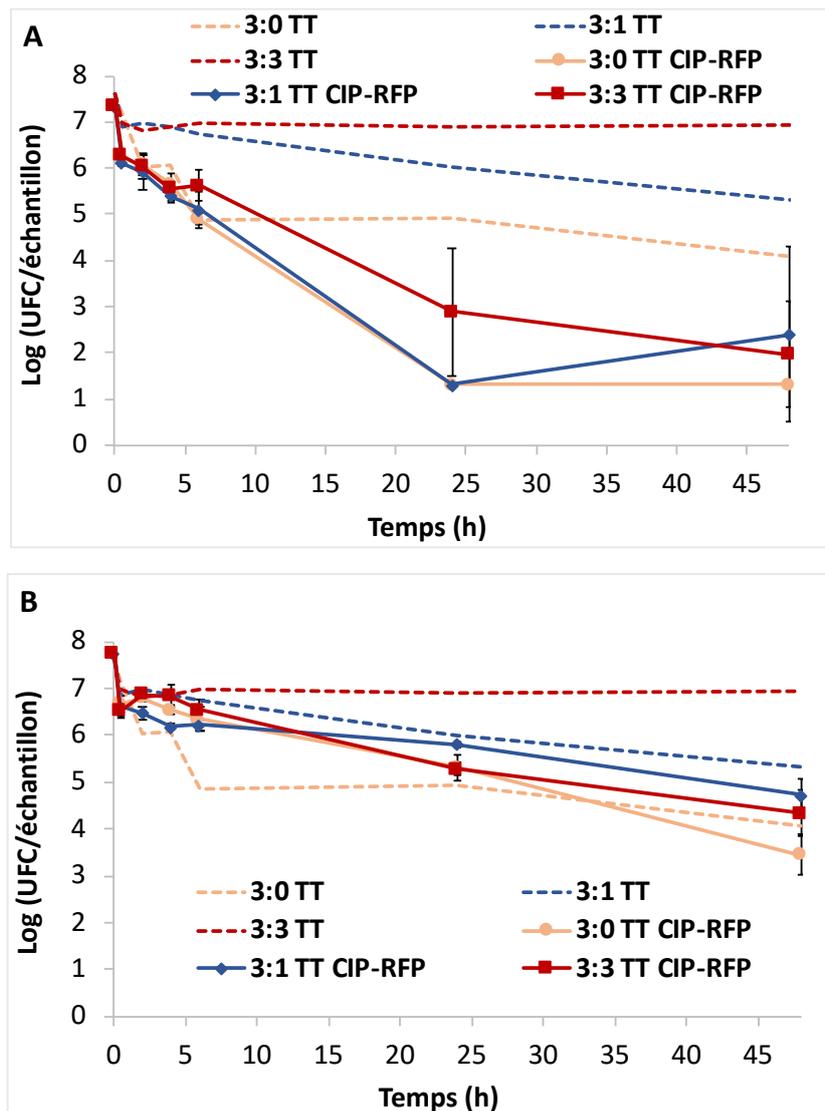


Figure 61 : Cinétique de la réduction bactérienne en fonction du temps et des différents ratios 3:0, 3:1 et 3:3 témoins ne contenant pas d'antibiotique (TT) et imprégnés de ciprofloxacine et rifampicine (TT CIP-RFP) sur les souches de *S. aureus* (A) et *E. coli* (B). N=3 échantillons

On peut observer sur la Figure 61 A une amélioration de l'activité antibactérienne lorsque les éponges sont imprégnées de l'association des deux ATBs comparativement aux témoins. À 24 h le nombre de colonies de *S. aureus* est réduit de 6,1 log₁₀ pour les éponges 3:0 TT CIP-RFP et 3:1 TT CIP-RFP et de 4,5 log₁₀ pour les éponges 3:3 TT CIP-RFP. L'activité antibactérienne persiste ensuite sans qu'aucune différence significative ne soit constatée entre les différents ratios ($p > 0,05$).

Sur *E. coli* (Figure 61 B), les cinétiques de l'inhibition sont plus lentes. Une réduction de 2,6 Log₁₀ pour les ratios 3:0 TT et 3:3 TT imprégnés, et de 2 Log₁₀ pour le ratio 3:1 TT CIP-RFP est

observé à 24 h. Le nombre de colonies continue de diminuer jusqu'à 48 h avec une baisse de 4,3 Log₁₀ pour les éponges 3:0 TT CIP-RFP et de 3,3 Log₁₀ pour les éponges 3:1 TT CIP-RFP et 3:3 TT CIP-RFP. Les éponges imprégnées de l'association de CIP-RFP montrent donc une activité bactéricide sur les deux souches Gram+ et Gram-. L'ensemble de ces résultats est regroupé Tableau 19.

L'activité antibactérienne des éponges imprégnées des deux ATBs est meilleure sur *S. aureus*. Elle est en revanche moins bonne sur *E. coli* que celle des éponges imprégnées de CIP seule. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus lors du test de diffusion et renforce l'hypothèse d'une compétition des ATBs pour se lier au CHT par des interactions ioniques. Les échantillons sont donc moins chargés en CIP, et la RFP possédant une faible activité sur les bactéries Gram-, les éponges sont moins efficaces.

Tableau 19 : Réduction bactérienne de *S. aureus* et *E. coli* après 24 h et 48 h de mise au contact des échantillons imprégnés de CIP-RFP

	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	24 h	48 h	24 h	48 h
3 :0 TT CIP-RFP	6,1 Log ₁₀	6,1 Log ₁₀	2,6 Log ₁₀	4,3 Log ₁₀
3 :1 TT CIP-RFP	6,1 Log ₁₀	6,1 Log ₁₀	2 Log ₁₀	3,3 Log ₁₀
3 :3 TT CIP-RFP	4,5 Log ₁₀	6,1 Log ₁₀	2,6 Log ₁₀	3,3 Log ₁₀

3.3. Conclusion

Cette dernière sous partie a permis d'évaluer *in vitro* le pouvoir antibactérien des éponges 3:0 TT, 3:1 TT et 3:3 TT imprégnées de CIP, de RFP et d'une association de CIP et RFP. Concernant les éponges imprégnées de CIP, les formulations 3:0 TT et 3:1 TT ont montré une bonne activité sur *S. aureus* et sur *E. coli*. En revanche, lorsque la RFP est utilisée seule, une inhibition bactérienne prolongée de tous les ratios n'est observée que sur *S. aureus*. Ceci est la conséquence de son spectre d'action limité sur les Gram-. Il est donc nécessaire, dans l'optique d'élaborer un dispositif médical pour le traitement des DFIs souvent polymicrobiennes, d'utiliser cette molécule en bi-thérapie. Une évaluation microbiologique a

donc été réalisée pour étudier le caractère antibactérien des éponges lorsqu'elles sont imprégnées de CIP et de RFP. Nous avons pu constater une amélioration de l'activité antibactérienne des éponges chargées de l'association d'ATBs sur *S. aureus*, suggérant une synergie d'action des deux molécules. Sur *E. coli*, malgré un pouvoir antibactérien prolongé, les éponges ont montré une activité antibactérienne moins importante liée à une diminution de la quantité de CIP absorbée lorsqu'elle est associée à la RFP. Il existe en effet une compétition des ATBs pour former les liaisons électrostatiques avec les groupements NH_3^+ libres du CHT. Pour conclure, l'ensemble de ces tests a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien des éponges imprégnées des ATBs seuls ou en association.

Chapitre 4 : Conclusions et perspectives

Conclusion et discussion générale

L'objectif de ce travail de thèse était d'élaborer un dispositif médical destiné à être imprégné dans une solution d'antibiotique(s) disponible(s) dans le milieu hospitalier, pour le traitement des infections du pied diabétique. L'arsenal thérapeutique dont disposent aujourd'hui les équipes de soignants reste encore insuffisant pour éradiquer ces infections associées à une haute morbi-mortalité. La mauvaise pénétrance des médicaments au site infecté est un des problèmes majeurs de leur prise en charge. La libération locale des antibiotiques, directement, dans la plaie permet de contourner cette problématique en augmentant les concentrations localement, et en réduisant le risque d'effets indésirables et d'émergence de résistances bactériennes par la prise par la voie générale de médicaments. Cette méthode d'administration (topique) a suscité l'intérêt de la communauté scientifique depuis plusieurs années, car elle permet l'utilisation d'un large choix de polymères, de formes galéniques et offre la possibilité d'incorporer des principes actifs de différentes manières (325). Dans ce contexte clinique, nous avons élaboré une éponge qui sera imprégnée d'antibiotiques à la demande, avant son insertion dans des plaies infectées. Les avantages d'une éponge sont sa taille et sa forme adaptables à tous les types de plaies des DFIs (souvent profondes, larges et avec des contours mal définis). En effet, il est nécessaire que le dispositif en recouvre toute la surface pour libérer efficacement les ATBs par diffusion dans la plaie. L'éponge élaborée est constituée de deux polymères, le CHT et le PCD. Le CHT est issu de la chitine, qui représente le second biopolymère le plus abondant. Son procédé de fabrication est simple est peu coûteux, ce qui en fait un matériau de choix. Il est aussi caractérisé par sa capacité à se protoner par ses groupements amines en milieu acide et à former des complexes de polyélectrolytes avec des composés de charges opposées. Le PCD est un polymère anionique capable de former des complexes d'inclusion dans la cavité de ses CDs avec les molécules actives et ainsi contrôler leur libération. Le mélange de ces deux polymères en milieu aqueux acide permet donc la formation d'un hydrogel physique, par formation d'un complexe de polyélectrolytes, qui a été lyophilisé pour obtenir l'éponge. La formation de ces hydrogels ne requiert pas de molécules réticulantes toxiques, ce qui les rend très attractifs pour une application biomédicale.

La première partie de ces travaux a donc été consacrée au développement et à la caractérisation de l'éponge. La méthode de fabrication de cette éponge a été mise au point par le mélange en solution acide des poudres de CHT et de PCD pour former un hydrogel physique de ratio CHT:PCD. Le mélange est réalisé dans un système de deux seringues connectées. L'hydrogel obtenu est injecté dans un moule et est ensuite lyophilisé pour obtenir une éponge. Plusieurs formulations, se différenciant par la quantité de PCD (3:0, 3:1, 3:3 et 3:5) ont été évaluées par un ensemble de tests afin de déterminer son impact sur les propriétés physico-chimiques de l'hydrogel dans un premier temps, puis celle de l'éponge. L'analyse rhéologique des hydrogels a révélé un comportement élastique de la préparation dès l'acidification du mélange. La meilleure stabilité a été observée pour la formulation 3:3 en raison de l'équilibre des charges positives et négatives entraînant la plus forte densité d'interactions électrostatiques. Cette formulation hautement reproductible pourrait faire l'objet d'une étude afin de concevoir un hydrogel injectable, chargé en principes actifs, pour une autre voie d'administration. Après lyophilisation, les éponges ont été traitées thermiquement à 140 °C pendant 1h30 afin d'étudier l'influence de cette réticulation sur le comportement du dispositif médical. La réaction de réticulation correspond à la conversion des interactions ioniques en liaisons amides. Aucune différence de microarchitecture n'a été relevée au MEB entre les éponges réticulées ou non. En revanche, une altération de la structure alvéolaire, interconnectée et spongieuse devenant compacte et irrégulière a été observée en fonction de la proportion de PCD. Nous avons aussi constaté au cours du travail une mauvaise reproductibilité de cette microarchitecture. Le contrôle de la congélation est le paramètre essentiel pour une régularité de production intra et inter lots. Il a été constaté une amélioration de cette reproduction lorsque la congélation est faite en deux étapes à deux températures distinctes (-10 °C suivit d'une phase à -45 °C) (301). L'utilisation d'un agent de nucléation dans la préparation permet aussi d'homogénéiser les productions, mais l'utilisation d'additif n'est pas toujours acceptable (FDA) dans la production de produits pharmaceutiques. (301)(326). Par ailleurs, Passot et *al.* ont montré que l'uniformité des échantillons était augmentée lorsqu'un traitement aux ultrasons leur était appliqué avant la congélation (327). Le laboratoire Praxair (USA) a récemment mis au point une technologie par "dépressurisation" (ControLyo™) qui permet d'induire de façon uniforme et simultanée la nucléation des

échantillons, entraînant une amélioration significative de la reproductibilité intra et inter lots (326). Ces méthodes pourraient être appliquées à notre dispositif pour améliorer sa reproductibilité. L'étude de la dégradation enzymatique a montré une perte de masse progressive des éponges pendant 7 jours. Une diminution moins importante a cependant été constatée avec l'ajout de PCD à la formulation et après réticulation grâce à la stabilisation du système par les liaisons covalentes. Après 3 jours, nous avons constaté un maintien de plus de 80 % de l'intégrité des éponges. Elles sont donc compatibles avec la nécessité de changement du traitement topique tous les 1 à 3 jours recommandé dans les soins des DFIs. Le taux de gonflement est également influencé par ces deux paramètres. L'absorption la plus importante a été observée pour les éponges réticulées et elle est inversement proportionnelle à la quantité de PCD dans le mélange. Le gonflement est une caractéristique importante dans le cadre de l'application clinique car il conditionnera la capacité d'absorption des principes actifs mais également des exsudats des plaies suintantes. Un taux de gonflement important est donc exigé pour remplir ce double rôle. Les tests mécaniques ont mis en évidence une amélioration de la résistance des éponges à la compression après traitement thermique avec une bonne compatibilité en terme de module d'Young des ratios 3:1 TT, 3:3 TT et 3:5 TT pour l'application clinique. En revanche, nous avons observé une déformation résiduelle de 20 % de tous les dispositifs qu'ils soient réticulés ou non après cette compression. Les pores pourraient avoir subi une modification de leur morphologie empêchant les échantillons de retrouver leur taille d'origine (284). Cette hypothèse doit être confirmée par une analyse au MEB de la microstructure des éponges après compression. De plus, l'évaluation mécanique a été conduite sur les éponges après hydratation dans une solution de PBS. Or, après la compression nous avons constaté une perte d'eau par le dispositif. Il faudra donc au moment de la découpe préconisée un surdimensionnement de 20 % pour couvrir la totalité de la surface de la plaie infectée. Enfin, il a été démontré que toutes les formulations traitées thermiquement ou non ne sont pas cytotoxiques lorsque les éponges sont mises au contact de cellules préostéoblastes. Elles sont des précurseurs des ostéoblastes qui sont impliqués dans la synthèse de la matrice osseuse. Nous avons fait le choix de travailler avec ces cellules car les DFIs sont souvent caractérisées par une atteinte osseuse profonde. Cependant, une étude complémentaire doit être réalisée pour prouver que le dispositif n'est pas cytotoxique pour les cellules épithéliales avec lesquelles il sera majoritairement au contact. A l'issue de

cette première partie, l'importance de la réticulation thermique a été mise en évidence. Les éponges non traitées thermiquement ont donc été abandonnées, ainsi que le ratio 3:5 TT qui répond le moins au cahier des charges en terme d'absorption.

Nous nous sommes ensuite intéressés au chargement des éponges avec deux ATBs. Notre choix s'est orienté vers la CIP et la RFP qui sont des ATBs de référence pour le traitement des DFIs. Il a été mis en évidence que la capacité d'absorption est influencée par le taux de gonflement de l'éponge, et surtout par la formation d'interactions ioniques des ATBs sous leur forme zwitterion avec les groupements amines protonés libres du CHT. L'ajout de PCD à la formulation entraîne une diminution de ces fonctions libres qui interagissent avec les groupements carboxylates du PCD. Une diminution de l'absorption des principes actifs a été observée en fonction de la proportion de PCD dans l'éponge. La CD ne forme donc pas de complexe d'inclusion pour une libération contrôlée de la CIP et la RFP (sous les formes galéniques utilisées) comme nous l'avions espéré. Il est cependant important de rappeler que le PCD joue un rôle dans le renforcement de la stabilité du système dans le temps et d'un point de vue mécanique. En ce qui concerne les paramètres de chargement du dispositif, il a été montré que l'absorption de l'éponge par la solution de CIP se stabilisait à partir de la 4^{ème} heure d'imprégnation. En revanche, un effet temps dépendant a pu être constaté lorsque les systèmes étaient imprégnés pendant 24 et 72 h dans la RFP. Or, la RFP ne peut être utilisée qu'en association car elle possède une faible activité sur les bactéries Gram-. En conséquence, c'est le temps d'imprégnation de la CIP de 4 h qui a été conservé pour la suite des travaux. Un temps d'imprégnation long n'est pas compatible avec l'application visée. En effet, le changement des pansements des DFIs est réalisé tous les 1 à 3 jours. Le dispositif doit donc pouvoir être imprégné très rapidement le jour du traitement pour répondre aux contraintes cliniques. Pour des temps d'imprégnation de 15-30 min et 1 h, nous avons observé une absorption à 80 % et 30 % pour le ratio 3:0 TT, de 50 et 10 % pour le ratio 3:1 TT, et de 60 et 30 % pour le ratio 3:3 TT. Une étude de l'activité antibactérienne des éponges imprégnées pendant ces temps courts doit donc être réalisée afin d'évaluer leur efficacité. Nous avons aussi constaté un effet concentration dépendant de la solution d'imprégnation de RFP sur son absorption. Deux phénomènes peuvent être mis en cause : 1) la RFP est capable d'interagir « avec elle-même » en s'auto associant via des interactions $\pi-\pi$ ce qui entrainerait

l'augmentation de la quantité absorbée. Cette hypothèse pourrait être confirmée par une étude isotherme de l'absorption de la RFP par les éponges à plusieurs concentrations. 2) une inclusion de l'ATB dans la CD qui permettrait de compenser la perte de l'absorption par le CHT. Cette dernière hypothèse doit être vérifiée par une étude RMN. L'étude de la libération des ATBs en conditions dynamiques (flux continu) a montré que la vitesse de cette libération est influencée par la capacité du ratio à absorber les ATBs. Nous avons constaté que plus l'éponge absorbe plus elle libère lentement. En revanche, quelle que soit la formulation, la totalité des principes actifs était libérée en 24 h après un effet *burst* pendant les premières heures. Wells et *al.* ont rapporté une libération prolongée sur 7 jours de leurs éponges de CHT imprégnées des deux ATBs en conditions statiques tandis que nous avons travaillé en conditions dynamiques (247). De plus, nous avons réalisé l'étude avec un débit similaire à celui d'un os chez un sujet sain. Or, chez les patients diabétiques le débit sanguin est diminué en raison des altérations de la régulation de la glycémie qui provoque des lésions des cellules endothéliales. Le faible débit sanguin de base et les dommages résultants dans les DFIs (tissus mal vascularisés) aggravent la diminution des apports sanguins qui entraînent une mauvaise pénétrance des ATBs (328)(329). Il serait donc intéressant d'étudier la vitesse de diffusion des ATBs sur un modèle de diffusion dans une gélose d'agar.

Les études *in vitro* de l'activité antibactérienne des éponges ont été menées sur *S. aureus* et *E. coli*, qui sont deux bactéries très souvent retrouvées dans les DFIs (23)(24)(25)(30). Les résultats ont montré une inhibition de la prolifération des deux bactéries prolongée jusqu'à 48 h pour les ratios 3:0 TT et 3:1 TT imprégnés de CIP. La formulation 3:3 TT présentait, quant à elle, une activité limitée aux premières heures de test. Concernant les éponges chargées en RFP, l'inhibition bactérienne était maintenue pendant un jour sur *S. aureus*. En revanche, *E. coli* était peu sensible au pouvoir antibactérien de ces éponges. En effet, la RFP est peu active sur les Gram-, nécessitant une association à un autre ATB pour le traitement des DFIs qui sont souvent polymicrobiennes. Les éponges ont donc été imprégnées dans une solution contenant un mélange de CIP et de RFP. Elles ont montré une inhibition de la prolifération prolongée jusqu'à 72 h sur *S. aureus*, suggérant une synergie d'action des deux ATBs. Il a été montré que les infections ostéo-articulaire à *S. aureus* étaient mieux contrôlées lors de l'utilisation en bithérapie de ces ATBs plutôt qu'en monothérapie (317). Malgré une bonne

activité observée sur *E. coli*, nous avons constaté que ces éponges étaient moins performantes que celles imprégnées de CIP seule. Il existe une compétition des ATBs pour former des liaisons électrostatiques avec les fonctions amines libres du CHT qui entraîne une diminution de l'absorption de la CIP et de l'activité antibactérienne sur la bactérie Gram-. L'évaluation par *Kill Time* a montré une réduction bactérienne importante et prolongée jusqu'à 48 h lorsque les bactéries étaient au contact des éponges imprégnées de CIP. En revanche, une activité antibactérienne (de 48 h) n'a été observée que sur *S. aureus* lorsque les échantillons étaient chargés en RFP. Les éponges de CIP-RFP présentaient, quant à elles, une diminution du nombre de colonies viables rapide et étendue jusqu'à 48 h. Il est important de noter que dans la littérature, les études rapportées sur ce type de dispositifs montrent des activités antibactériennes prolongées jusqu'à une semaine. Or, les soins des plaies des DFIs sont réalisés tous les 1 à 3 jours. Nos éponges sont donc compatibles avec l'indication clinique visée. Par ailleurs, il serait intéressant de réaliser des tests de *Kill Time* plus prolongés dans le temps pour évaluer si les dispositifs contenant de la CIP possèdent un effet post-antibiotique. Cette particularité se traduit par l'inhibition de la croissance bactérienne conservée au-delà de l'élimination du principe actif dans le milieu. Cet effet de la CIP a été montré par de nombreuses équipes depuis 1940 et notamment par Chin et Neu (330). Ce phénomène est particulièrement observé sur *E. coli* avec un effet post antibiotique prolongé de quelques heures (331). Il pourrait être la conséquence de la lente « défixation » de l'ATB de ses sites d'action. Ainsi, le principe actif est encore présent sur ces derniers, même si les concentrations dans le plasma sont très faibles. Cette propriété ne doit pas être négligée car elle conditionne les modalités d'administration du médicament. En effet, les ATBs ayant un effet post-antibiotique sont administrés moins souvent par voie systémique.

En conclusion, ce travail de thèse aura permis l'élaboration d'un dispositif médical sous la forme d'une éponge à base d'un mélange de CHT:PCD. Plusieurs ratios de ce mélange ont été évalués au cours des expérimentations afin de déterminer celui qui répond le mieux au cahier des charges établi. L'ensemble de ces résultats a montré une bonne performance des éponges 3:0 TT et 3:1 TT en termes d'absorption des ATBs, de libération et d'activité antibactérienne. Par ailleurs, le ratio 3:3 TT constitue le meilleur équilibre de charges positives et négatives

avec une bonne tenue mécanique, et présente un pouvoir antibactérien similaire à celui des autres ratios lorsqu'il est imprégné de l'association de CIP-RFP. Avant de valider la formulation définitive, il est nécessaire d'évaluer l'activité de ces dispositifs sur les biofilms. En effet, la formation de biofilms est très fréquente dans les DFIs. Enfin, l'efficacité du système final ainsi développé devra être démontrée *in vivo* sur un modèle animal. Ces derniers points sont présentés dans la partie suivante (perspectives).

Perspectives

- Évaluation de l'activité antibactérienne sur un biofilm

La formation de biofilms est très souvent observée dans les DFIs. Il est donc essentiel d'évaluer l'activité antibactérienne du dispositif sur cette communauté multicellulaire complexe. Les biofilms *in vitro* sont formés par dépôts de bactéries avec des nutriments dans des plaques 96 puits (332). Après centrifugation et élimination du surnageant, le biofilm préformé est mis au contact des agents antibactériens. Dans le cadre de notre étude, une libération statique sera réalisée au préalable, et les milieux de libération prélevés à intervalles de temps réguliers seront testés pour évaluer la destruction de la matrice au cours du temps. Cette destruction peut être révélée par fluorescence ou densité optique (méthode du cristal violet) (333)(334).

- Stérilisation du dispositif médical

Il est essentiel d'étudier l'impact de la stérilisation sur le dispositif médical développé. Plusieurs types de stérilisation vont être testés : rayonnement gamma, rayonnement bêta et oxyde d'éthylène. L'effet de la stérilisation sur les propriétés physico-chimique et biologiques sera étudiée. La méthode permettant de conserver l'intégrité, la biocompatibilité, et l'efficacité antibactérienne sera sélectionnée.

- Étude *in vivo*

Les dispositifs médicaux pour le traitement des plaies chroniques sont habituellement évalués *in vivo* sur des modèles de lapin, de rat, de souris et de cochon. La souris représente un bon modèle pour les plaies infectées des ulcères des pieds diabétiques. Ce modèle présente l'avantage de pouvoir évaluer l'efficacité de nombreux agents. Le diabète est induit chez l'animal par méthodes chimique ou génétique. L'efficacité du dispositif médical est

ensuite évaluée par son efficacité à induire la cicatrisation d'une plaie sur le dos de la souris comparativement à un contrôle (335). Le cochon est également un modèle utilisé pour les plaies infectées. Les plaies sont induites sur le dos de l'animal etensemencées avec des bactéries qui entraînent la formation d'un biofilm. La peau et la physiologie du cochon sont similaires à celles de l'homme ce qui en fait un excellent modèle. En revanche, l'expérimentation animale sur le cochon est couteuse et les modifications génétiques de l'animal sont difficiles (335).

Références bibliographiques

1. Dittrich HM. [History of the discovery of pancreatic diabetes by von Mering and Minkowski 1889. A historical overview on the occasion of the 100th anniversary]. *Z Gesamte Inn Med.* 1989 Jun 1;44(11):335–40.
2. Mosbah H, Andreelli F. Physiologie de la sécrétion d'insuline. *Médecine Mal Métaboliques.* 2012 Jun;6(3):215–9.
3. Bellin (2) EM (1) and MD. Secretion of Insulin in Response to Diet and Hormones. *Pancreapedia Exocrine Pancreas Knowl Base* [Internet]. 2016 Mar 30; Available from: [/reviews/secretion-of-insulin-in-response-to-diet-and-hormones](#)
4. Normal Physiology of Insulin Secretion and Action. In: *Handbook of Diabetes* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2010. p. 22–34. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781444391374.ch5>
5. Seino S, Shibasaki T, Minami K. β -Cell biology of insulin secretion. In: *International Textbook of Diabetes Mellitus* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2015. p. 96–107. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118387658.ch7>
6. Wilcox G. Insulin and Insulin Resistance. *Clin Biochem Rev.* 2005 May;26(2):19–39.
7. Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A. The cell biology of systemic insulin function. *J Cell Biol.* 2018 Jul 2;217(7):2273–89.
8. (PDF) Diabetes mellitus – A devastating metabolic disorder [Internet]. ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/publication/271199994_Diabetes_mellitus_-_A_devastating_metabolic_disorder
9. Masson E. DIAGNOSTIC ET CLASSIFICATION DU DIABÈTE SUCRÉ LES NOUVEAUX CRITÈRES [Internet]. EM-Consulte. Available from: <https://www.em-consulte.com/article/79784/diagnostic-et-classification-du-diabete-sucré-les->
10. Kharroubi AT, Darwish HM. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes.* 2015 Jun 25;6(6):850–67.
11. Cheisson G, Jacqueminet S, Cosson E, Ichai C, Leguerrier A-M, Nicolescu-Catargi B, et al. Texte 1 : rappels sur l'hyperglycémie. *Anesth Réanimation.* 2017 May 1;3(3):212–7.
12. Diabetes [Internet]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact->

sheets/detail/diabetes

13. IDF Diabetes Atlas [Internet]. Available from: <https://idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas.html>
14. International Diabetes Federation - Home [Internet]. Available from: <https://idf.org/52-about-diabetes.html>
15. Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ*. 2004 Mar 27;328(7442):750–4.
16. Adapa D, Tk S. A Review on Diabetes Mellitus: Complications, Management and Treatment Modalities. *Res Rev J Med Health Sci* [Internet]. 1970 Jan 1;4(3). Available from: <http://www.rroij.com/peer-reviewed/a-review-on-diabetes-mellitus-complications-management-and-treatment-modalities-52788.html>
17. Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, Darsow T, Eckel RH, Groop L, et al. Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. *Diabetes*. 2017 Feb;66(2):241–55.
18. Kerner W, Brückel J. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2014 Jul;122(7):384–6.
19. Alam U, Asghar O, Azmi S, Malik RA. General aspects of diabetes mellitus. In: *Handbook of Clinical Neurology* [Internet]. Elsevier; 2014. p. 211–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444534804000151>
20. Wilcox G. Insulin and Insulin Resistance. *Clin Biochem Rev*. 2005 May;26(2):19–39.
21. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000 Jul 15;106(2):171–6.
22. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. β -Cell Deficit and Increased β -Cell Apoptosis in Humans With Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2003 Jan 1;52(1):102–10.
23. Lipsky BA, Aragón-Sánchez J, Diggle M, Embil J, Kono S, Lavery L, et al. IWGDF guidance on the diagnosis and management of foot infections in persons with diabetes: IWGDF Guidance on Foot Infections. *Diabetes Metab Res Rev*. 2016 Jan;32:45–74.
24. Uçkay I, Gariani K, Pataky Z, Lipsky BA. Diabetic foot infections: state-of-the-art. *Diabetes Obes Metab*. 2014 Apr;16(4):305–16.
25. Netgen. Microbiologie et traitement antibiotique du pied diabétique infecté

[Internet]. Revue Médicale Suisse. Available from: <https://www.revmed.ch/RMS/2016/RMS-N-514/Microbiologie-et-traitement-antibiotique-du-pied-diabetique-infecte>

26. Netgen. Pied diabétique infecté : du diagnostic à la prise en charge [Internet]. Revue Médicale Suisse. Available from: <https://www.revmed.ch/RMS/2015/RMS-N-477/Pied-diabetique-infecte-du-diagnostic-a-la-prise-en-charge>

27. Noor S, Khan RU, Ahmad J. Understanding Diabetic Foot Infection and its Management. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev*. 2017 Apr;11(2):149–56.

28. Prise en charge du pied diabétique infecté. Texte long. *Médecine Mal Infect*. 2007 Jan;37(1):26–50.

29. Jneid J, Lavigne JP, La Scola B, Cassir N. The diabetic foot microbiota: A review. *Hum Microbiome J*. 2017 Dec 1;5–6:1–6.

30. 2018_martini_pied_diabetique.pdf [Internet]. Available from: https://www.sfdiabete.org/files/files/JNDES/2018/2018_martini_pied_diabetique.pdf

31. Pied diabétique [Internet]. doctinews. Available from: <https://www.doctinews.com/index.php/doctinews/alternative/item/5357-pied-diabetique>

32. Remèdes pour le pied diabétique | Remèdes de Grand-Mère [Internet]. Available from: <https://www.remedes-de-grand-mere.com/remede/remedes-pour-le-pied-diabetique/>

33. Senneville É. L'ostéite du pied diabétique (OPD). :59.

34. Senneville E, Robineau O. Treatment options for diabetic foot osteomyelitis. *Expert Opin Pharmacother*. 2017 May 24;18(8):759–65.

35. Winkler H, Haiden P. Treatment of Chronic Bone Infection. *Oper Tech Orthop*. 2016 Mar;26(1):2–11.

36. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet Lond Engl*. 2004 Jul 24;364(9431):369–79.

37. Hurlow JJ, Humphreys GJ, Bowling FL, McBain AJ. Diabetic foot infection: A critical complication. *Int Wound J*. 2018 Oct 1;15(5):814–21.

38. Johani K, Fritz BG, Bjarnsholt T, Lipsky BA, Jensen SO, Yang M, et al. Understanding the microbiome of diabetic foot osteomyelitis: insights from molecular and microscopic approaches. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2019 Mar;25(3):332–9.

39. Johani K, Malone M, Jensen S, Gosbell I, Dickson H, Hu H, et al. Microscopy visualisation confirms multi-species biofilms are ubiquitous in diabetic foot ulcers. *Int Wound J*. 2017 Dec;14(6):1160–9.
40. Gunning P. Que sont-ils ? Où sont-ils ? Quels impacts ont-ils sur les soins des plaies ? :3.
41. biofilm_made_easy_francais.pdf [Internet]. Available from: https://www.oiiq.org/sites/default/files/uploads/pdf/l_ordre/ordres_regionaux/ORIIM/2012/biofilm_made_easy_francais.pdf
42. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet Lond Engl*. 2001 Jul 14;358(9276):135–8.
43. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol*. 2009;11(7):1034–43.
44. Implantable antimicrobial biomaterials for local drug delivery in bone infection models. *Acta Biomater* [Internet]. 2019 Jan 14; Available from: <https://www-sciencedirect-com.ressources-electroniques.univ-lille.fr/science/article/pii/S1742706119300352>
45. Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*. 2017;33(3):300–5.
46. (PDF) Environmental factors that shape biofilm formation | Academic Article [Internet]. ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/publication/279308459_Environmental_factors_that_shape_biofilm_formation
47. Prise en charge du pied diabétique infecté. Texte long. *Médecine Mal Infect*. 2007 Jan;37(1):26–50.
48. Hurlow JJ, Humphreys GJ, Bowling FL, McBain AJ. Diabetic foot infection: A critical complication. *Int Wound J*. 2018 Oct;15(5):814–21.
49. Metcalf DG, Bowler PG. Biofilm delays wound healing: A review of the evidence. *Burns Trauma*. 2013 Jun;1(1):5.
50. pansements_synthese_rapport.pdf [Internet]. Available from: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2009-01/pansements_synthese_rapport.pdf
51. Boateng J, Catanzano O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing--A Review. *J Pharm Sci*. 2015 Nov;104(11):3653–80.

52. Mayet N, Choonara YE, Kumar P, Tomar LK, Tyagi C, Du Toit LC, et al. A comprehensive review of advanced biopolymeric wound healing systems. *J Pharm Sci.* 2014 Aug;103(8):2211–30.
53. Frenkel JS. The role of hyaluronan in wound healing. *Int Wound J.* 2014;11(2):159–63.
54. Chen C-P, Hung W, Lin S-H. Effectiveness of hyaluronic acid for treating diabetic foot: a systematic review and meta-analysis. *Dermatol Ther.* 2014 Dec;27(6):331–6.
55. Humbert P, Mikosinki J, Benchikhi H, Allaert F-A. Efficacy and safety of a gauze pad containing hyaluronic acid in treatment of leg ulcers of venous or mixed origin: a double-blind, randomised, controlled trial. *Int Wound J.* 2013;10(2):159–66.
56. Edmonds M, Lázaro-Martínez JL, Alfayate-García JM, Martini J, Petit J-M, Rayman G, et al. Sucrose octasulfate dressing versus control dressing in patients with neuroischaemic diabetic foot ulcers (Explorer): an international, multicentre, double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018 Mar 1;6(3):186–96.
57. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc.* 2008 Oct;16(5):585–601.
58. Simões D, Miguel SP, Ribeiro MP, Coutinho P, Mendonça AG, Correia IJ. Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV.* 2018 Jun;127:130–41.
59. Agarwal A, Nelson TB, Kierski PR, Schurr MJ, Murphy CJ, Czuprynski CJ, et al. Polymeric multilayers that localize the release of chlorhexidine from biologic wound dressings. *Biomaterials.* 2012 Oct;33(28):6783–92.
60. Rossi S, Marciello M, Sandri G, Ferrari F, Bonferoni MC, Papetti A, et al. Wound Dressings Based on Chitosans and Hyaluronic Acid for the Release of Chlorhexidine Diacetate in Skin Ulcer Therapy. *Pharm Dev Technol.* 2007 Jan;12(4):415–22.
61. Flores C, Lopez M, Tabary N, Neut C, Chai F, Betbeder D, et al. Preparation and characterization of novel chitosan and β -cyclodextrin polymer sponges for wound dressing applications. *Carbohydr Polym.* 2017 Oct 1;173:535–46.
62. Barillo DJ, Marx DE. Silver in medicine: A brief history BC 335 to present. *Burns.* 2014 Dec 1;40:S3–8.
63. Fontenoy C, Sellal K-O. L'argent dans les dispositifs médicaux : marketing ou réel

intérêt clinique ? Pharm Hosp. 2010 Sep;45(3):131–41.

64. MacGregor L. RÉDACTRICE EN CHEF : :24.

65. Seabrook GR, Edmiston CE, Schmitt DD, Krepel C, Bandyk DF, Towne JB. Comparison of serum and tissue antibiotic levels in diabetes-related foot infections. *Surgery*. 1991 Oct;110(4):671–6; discussion 676-677.

66. Klemm KW. Antibiotic Bead Chains: *Clin Orthop*. 1993 Oct;NA;(295):63–76.

67. Roeder B, Van Gils CC, Maling S. Antibiotic beads in the treatment of diabetic pedal osteomyelitis. *J Foot Ankle Surg*. 2000 Mar;39(2):124–30.

68. Morley R, Lopez F, Webb F. Calcium sulphate as a drug delivery system in a deep diabetic foot infection. *The Foot*. 2016 Jun;27:36–40.

69. Elmarsafi T, Oliver NG, Steinberg JS, Evans KK, Attinger CE, Kim PJ. Long-Term Outcomes of Permanent Cement Spacers in the Infected Foot. *J Foot Ankle Surg*. 2017 Mar;56(2):287–90.

70. Panagopoulos P, Drosos G, Maltezos E, Papanas N. Local Antibiotic Delivery Systems in Diabetic Foot Osteomyelitis: Time for One Step Beyond? *Int J Low Extrem Wounds*. :5.

71. Bertazzoni Minelli E, Della Bora T, Benini A. Different microbial biofilm formation on polymethylmethacrylate (PMMA) bone cement loaded with gentamicin and vancomycin. *Anaerobe*. 2011 Dec;17(6):380–3.

72. Melamed EA, Peled E. Antibiotic Impregnated Cement Spacer for Salvage of Diabetic Osteomyelitis. *Foot Ankle Int*. 2012 Mar;33(3):213–9.

73. A Closer Look At Diabetic Foot Infections [Internet]. *Podiatry Today*. Available from: <https://www.podiatrytoday.com/article/4284>

74. Melamed EA, Peled E. Antibiotic Impregnated Cement Spacer for Salvage of Diabetic Osteomyelitis. *Foot Ankle Int*. 2012 Mar;33(3):213–9.

75. Gauland C. Managing Lower-Extremity Osteomyelitis Locally with Surgical Debridement and Synthetic Calcium Sulfate Antibiotic Tablets: *Adv Skin Wound Care*. 2011 Nov;24(11):515–23.

76. Jogia RM, Modha DE, Nisal K, Berrington R, Kong M-F. Use of Highly Purified Synthetic Calcium Sulfate Impregnated With Antibiotics for the Management of Diabetic Foot Ulcers Complicated by Osteomyelitis: Figure 1. *Diabetes Care*. 2015 May;38(5):e79–80.

77. Drampalos E, Mohammad HR, Kosmidis C, Balal M, Wong J, Pillai A. Single stage

treatment of diabetic calcaneal osteomyelitis with an absorbable gentamicin-loaded calcium sulphate/hydroxyapatite biocomposite: The Silo technique. *The Foot*. 2018 Mar;34:40–4.

78. Knaepler H. Local application of gentamicin-containing collagen implant in the prophylaxis and treatment of surgical site infection in orthopaedic surgery. *Int J Surg*. 2012 Jan 1;10:S15–20.

79. Varga M, Sixta B, Bem R, Matia I, Jirkovska A, Adamec M. Application of gentamicin-collagen sponge shortened wound healing time after minor amputations in diabetic patients – a prospective, randomised trial. *Arch Med Sci*. 2014;2:283–7.

80. Uçkay I, Kressmann B, Tommaso SD, Portela M, Alwan H, Vuagnat H, et al. A randomized controlled trial of the safety and efficacy of a topical gentamicin–collagen sponge in diabetic patients with a mild foot ulcer infection. *SAGE Open Med*. :5.

81. Uçkay I, Kressmann B, Malacarne S, Toumanova A, Jaafar J, Lew D, et al. A randomized, controlled study to investigate the efficacy and safety of a topical gentamicin-collagen sponge in combination with systemic antibiotic therapy in diabetic patients with a moderate or severe foot ulcer infection. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2018 Dec;18(1). Available from: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-018-3253-z>

82. Koetting MC, Peters JT, Steichen SD, Peppas NA. Stimulus-responsive hydrogels: Theory, modern advances, and applications. *Mater Sci Eng R Rep*. 2015 Jul;93:1–49.

83. Ullah F, Othman MBH, Javed F, Ahmad Z, Akil HMd. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Mater Sci Eng C*. 2015 Dec;57:414–33.

84. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010 Jan;62(1):83–99.

85. Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A. Intelligent Drug Delivery Systems: Polymeric Micelles and Hydrogels. *Mini-Rev Med Chem*. 2008 Oct 1;8(11):1065–74.

86. Peppas N. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm*. 2000 Jul 3;50(1):27–46.

87. Kishida A, Ikada Y. Hydrogels for Biomedical and Pharmaceutical Applications. In: Dumitriu S, editor. *Polymeric Biomaterials, Revised and Expanded* [Internet]. CRC Press; 2001. Available from: <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/9780203904671.ch6>

88. Bahram M, Mohseni N, Moghtader M. An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications. In: Majee SB, editor. *Emerging Concepts in Analysis and Applications of*

Hydrogels [Internet]. InTech; 2016. Available from:

<http://www.intechopen.com/books/emerging-concepts-in-analysis-and-applications-of-hydrogels/an-introduction-to-hydrogels-and-some-recent-applications>

89. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012 Dec;64:18–23.
90. Lee J-H, Kim H-W. Emerging properties of hydrogels in tissue engineering. *J Tissue Eng* [Internet]. 2018 Mar 29;9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5881958/>
91. Mezger TG. *The rheology Handbook.* 2nd ed. 2006.
92. Basics of rheology :: Anton Paar Wiki [Internet]. Anton Paar. Available from: <https://wiki.anton-paar.com/en/basics-of-rheology/>
93. McLemore R. Rheological properties of injectable biomaterials. In: *Injectable Biomaterials* [Internet]. Elsevier; 2011. p. 46–60. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781845695880500036>
94. Cours de rhéologie [Internet]. Available from: <https://www-liphy.ujf-grenoble.fr/pagesperso/verdier/Cours.pdf>
95. Borzacchiello A, Ambrosio L. Structure-Property Relationships in Hydrogels. In: *Hydrogels* [Internet]. Milano: Springer Milan; 2009. p. 9–20. Available from: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-88-470-1104-5_2
96. Chen MH, Wang LL, Chung JJ, Kim Y-H, Atluri P, Burdick JA. Methods To Assess Shear-Thinning Hydrogels for Application As Injectable Biomaterials. *ACS Biomater Sci Eng.* 2017 Dec 11;3(12):3146–60.
97. Rheometer: MCR 102, MCR 302, MCR 502 :: Anton-Paar.com [Internet]. Anton Paar. Available from: <https://www.anton-paar.com/corp-en/products/details/rheometer-mcr-102-302-502/>
98. Varaprasad K, Raghavendra GM, Jayaramudu T, Yallapu MM, Sadiku R. A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications. *Mater Sci Eng C.* 2017 Oct;79:958–71.
99. Peppas NA, Hilt JZ, Khademhosseini A, Langer R. Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology. *Adv Mater.* 2006 Jun 6;18(11):1345–60.
100. Su W-Y, Chen Y-C, Lin F-H. Injectable oxidized hyaluronic acid/adipic acid dihydrazide

- hydrogel for nucleus pulposus regeneration. *Acta Biomater.* 2010 Aug;6(8):3044–55.
101. Lai J-Y, Ma DH-K, Cheng H-Y, Sun C-C, Huang S-J, Li Y-T, et al. Ocular biocompatibility of carbodiimide cross-linked hyaluronic acid hydrogels for cell sheet delivery carriers. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2010;21(3):359–76.
102. Zhu M, Feng Q, Sun Y, Li G, Bian L. Effect of cartilaginous matrix components on the chondrogenesis and hypertrophy of mesenchymal stem cells in hyaluronic acid hydrogels. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2017 Nov;105(8):2292–300.
103. Yamamoto S, Hirata A, Ishikawa S, Ohta K, Nakamura K, Okinami S. Feasibility of using gelatin-microbial transglutaminase complex to repair experimental retinal detachment in rabbit eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol.* 2013 Apr;251(4):1109–14.
104. Chen Y-C, Lin R-Z, Qi H, Yang Y, Bae H, Melero-Martin JM, et al. Functional Human Vascular Network Generated in Photocrosslinkable Gelatin Methacrylate Hydrogels. *Adv Funct Mater.* 2012 May 23;22(10):2027–39.
105. Jiang X, Liu J, Liu Q, Lu Z, Zheng L, Zhao J, et al. Therapy for cartilage defects: functional ectopic cartilage constructed by cartilage-simulating collagen, chondroitin sulfate and hyaluronic acid (CCH) hybrid hydrogel with allogeneic chondrocytes. *Biomater Sci.* 2018 May 29;6(6):1616–26.
106. Heo J, Koh RH, Shim W, Kim HD, Yim H-G, Hwang NS. Riboflavin-induced photocrosslinking of collagen hydrogel and its application in meniscus tissue engineering. *Drug Deliv Transl Res.* 2016 Apr;6(2):148–58.
107. Boido M, Ghibaudi M, Gentile P, Favaro E, Fusaro R, Tonda-Turo C. Chitosan-based hydrogel to support the paracrine activity of mesenchymal stem cells in spinal cord injury treatment. *Sci Rep.* 2019 Apr 25;9(1):6402.
108. Hu H, Ye B, Lv Y, Zhang Q. Preparing antibacterial and in-situ formable double crosslinking chitosan/hyaluronan composite hydrogels. *Mater Lett.* 2019 Nov;254:17–20.
109. Palomino Durand, C. Hydrogels injectables et éponges à base de complexe polyélectrolytes (chitosane/polymère de cyclodextrine) pour une application en ingénierie tissulaire osseuse. Université de Lille;
110. Flores C. Substituts hybrides (polymères/biocéramiques) à libération prolongée d'antibiotiques pour le traitement des infections osseuses. Université de Lille;

111. Moxon SR, Corbett NJ, Fisher K, Potjewyd G, Domingos M, Hooper NM. Blended alginate/collagen hydrogels promote neurogenesis and neuronal maturation. *Mater Sci Eng C*. 2019 Nov 1;104:109904.
112. Lv X, Liu Y, Song S, Tong C, Shi X, Zhao Y, et al. Influence of chitosan oligosaccharide on the gelling and wound healing properties of injectable hydrogels based on carboxymethyl chitosan/alginate polyelectrolyte complexes. *Carbohydr Polym*. 2019 Feb;205:312–21.
113. Alsharabasy AM, Moghannem SA, El-Mazny WN. Physical preparation of alginate/chitosan polyelectrolyte complexes for biomedical applications. *J Biomater Appl*. 2016 Feb;30(7):1071–9.
114. Lai W-F, Hu C, Deng G, Lui K-H, Wang X, Tsoi T-H, et al. A biocompatible and easy-to-make polyelectrolyte dressing with tunable drug delivery properties for wound care. *Int J Pharm*. 2019 Jul 20;566:101–10.
115. Jalali Monfared M, Nasirinezhad F, Ebrahimi-Barough S, Hasanzade G, Saberi H, Tavangar SM, et al. Transplantation of miR-219 overexpressed human endometrial stem cells encapsulated in fibrin hydrogel in spinal cord injury. *J Cell Physiol*. 2019 Apr 14;jcp.28527.
116. Gupta N, Cruz MA, Nasser P, Rosenberg JD, Iatridis JC. Fibrin-Genipin Hydrogel for Cartilage Tissue Engineering in Nasal Reconstruction. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2019 Jul;128(7):640–6.
117. Long J, Etxeberria AE, Nand AV, Bunt CR, Ray S, Seyfoddin A. A 3D printed chitosan-pectin hydrogel wound dressing for lidocaine hydrochloride delivery. *Mater Sci Eng C*. 2019 Nov 1;104:109873.
118. Markov PA, Khramova DS, Shumikhin KV, Nikitina IR, Beloserev VS, Martinson EA, et al. Mechanical properties of the pectin hydrogels and inflammation response to their subcutaneous implantation [Internet]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2019. Available from: <https://onlinelibrary-wiley-com.gate2.inist.fr/doi/abs/10.1002/jbm.a.36721>
119. Abbasi M, Sohail M, Minhas MU, Khan S, Hussain Z, Mahmood A, et al. Novel biodegradable pH-sensitive hydrogels: An efficient controlled release system to manage ulcerative colitis. *Int J Biol Macromol*. 2019 Sep 1;136:83–96.
120. Sahiner N, Sagbas S, Sahiner M, Silan C, Aktas N, Turk M. Agar/Chitosan IPN Thin

Hydrogel Films with Antimicrobial and Antioxidant Properties for Potential Dressing Applications. *Curr Appl Polym Sci*. 2017 May 11;1(1):52–62.

121. Cho IS, Ooya T. Tuned cell attachments by double-network hydrogels consisting of glycol chitosan, carboxymethyl cellulose and agar bearing robust and self-healing properties. *Int J Biol Macromol*. 2019 Aug 1;134:262–8.

122. Zhou Y, Zhao J, Sun X, Li S, Hou X, Yuan X, et al. Rapid Gelling Chitosan/Polylysine Hydrogel with Enhanced Bulk Cohesive and Interfacial Adhesive Force: Mimicking Features of Epineurial Matrix for Peripheral Nerve Anastomosis. *Biomacromolecules*. 2016 Feb 8;17(2):622–30.

123. Zou Y-J, He S-S, Du J-Z. ϵ -Poly(L-lysine)-based Hydrogels with Fast-acting and Prolonged Antibacterial Activities. *Chin J Polym Sci*. 2018 Nov 1;36(11):1239–50.

124. Van Tomme SR, Hennink WE. Biodegradable dextran hydrogels for protein delivery applications. *Expert Rev Med Devices*. 2007 Mar;4(2):147–64.

125. Du X, Liu Y, Wang X, Yan H, Wang L, Qu L, et al. Injectable hydrogel composed of hydrophobically modified chitosan/oxidized-dextran for wound healing. *Mater Sci Eng C*. 2019 Nov;104:109930.

126. Sun G, Zhang X, Shen Y-I, Sebastian R, Dickinson LE, Fox-Talbot K, et al. Dextran hydrogel scaffolds enhance angiogenic responses and promote complete skin regeneration during burn wound healing. *Proc Natl Acad Sci*. 2011 Dec 27;108(52):20976–81.

127. Vunain E, Mishra AK, Mamba BB. Fundamentals of chitosan for biomedical applications. In: *Chitosan Based Biomaterials Volume 1* [Internet]. Elsevier; 2017. p. 3–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081002308000017>

128. Mittal H, Ray SS, Kaith BS, Bhatia JK, Sukriti, Sharma J, et al. Recent progress in the structural modification of chitosan for applications in diversified biomedical fields. *Eur Polym J*. 2018 Dec;109:402–34.

129. Muxika A, Etxabide A, Uranga J, Guerrero P, de la Caba K. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *Int J Biol Macromol*. 2017 Dec;105:1358–68.

130. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int J Food Microbiol*. 2010 Nov 15;144(1):51–63.

131. Moura LIF, Dias AMA, Carvalho E, de Sousa HC. Recent advances on the development

- of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment--a review. *Acta Biomater.* 2013 Jul;9(7):7093–114.
132. Andrade F, Goycoolea F, Chiappetta DA, das Neves J, Sosnik A, Sarmiento B. Chitosan-Grafted Copolymers and Chitosan-Ligand Conjugates as Matrices for Pulmonary Drug Delivery [Internet]. *International Journal of Carbohydrate Chemistry.* 2011. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ijcc/2011/865704/>
133. Baldrick P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2010 Apr;56(3):290–9.
134. Rodrigues S, Dionísio M, López CR, Grenha A. Biocompatibility of Chitosan Carriers with Application in Drug Delivery. *J Funct Biomater.* 2012 Sep 17;3(3):615–41.
135. Gaspar R, Duncan R. Polymeric carriers: Preclinical safety and the regulatory implications for design and development of polymer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009 Nov;61(13):1220–31.
136. Anitha A, Sowmya S, Kumar PTS, Deepthi S, Chennazhi KP, Ehrlich H, et al. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. *Prog Polym Sci.* 2014 Sep;39(9):1644–67.
137. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci.* 2011 Aug;36(8):981–1014.
138. Dutta PK, Rinki K, Dutta J. Chitosan: A Promising Biomaterial for Tissue Engineering Scaffolds. In: Jayakumar R, Prabakaran M, Muzzarelli RAA, editors. *Chitosan for Biomaterials II* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 45–79. Available from: http://link.springer.com/10.1007/12_2011_112
139. Domard A, Domard M. Chitosan: Structure-Properties Relationship and Biomedical Applications. In: Dumitriu S, editor. *Polymeric Biomaterials, Revised and Expanded* [Internet]. CRC Press; 2001. Available from: <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/9780203904671.ch9>
140. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010 Jan;62(1):3–11.
141. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci.* 2006 Jul;31(7):603–32.
142. Chung Y-C, Chen C-Y. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresour Technol.* 2008 May;99(8):2806–14.

143. Goy RC, Morais STB, Assis OBG. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. *Rev Bras Farmacogn.* 2016 Jan;26(1):122–7.
144. Moratti SC, Cabral JD. Antibacterial properties of chitosan. In: *Chitosan Based Biomaterials Volume 1* [Internet]. Elsevier; 2017. p. 31–44. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081002308000029>
145. Younes I, Sellimi S, Rinaudo M, Jellouli K, Nasri M. Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. *Int J Food Microbiol.* 2014 Aug;185:57–63.
146. Jennings JA. 7 - Controlling chitosan degradation properties in vitro and in vivo. In: Jennings JA, Bumgardner JD, editors. *Chitosan Based Biomaterials Volume 1* [Internet]. Woodhead Publishing; 2017. p. 159–82. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081002308000078>
147. Szymańska E, Winnicka K. Stability of Chitosan—A Challenge for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Mar Drugs.* 2015 Apr 1;13(4):1819–46.
148. Ibrahim HR, Kato A, Kobayashi K. Antimicrobial effects of lysozyme against gram-negative bacteria due to covalent binding of palmitic acid. *J Agric Food Chem.* 1991 Nov 1;39(11):2077–82.
149. Sogias IA, Williams AC, Khutoryanskiy VV. Why is Chitosan Mucoadhesive? *Biomacromolecules.* 2008 Jul;9(7):1837–42.
150. Bano I, Arshad M, Yasin T, Ghauri MA, Younus M. Chitosan: A potential biopolymer for wound management. *Int J Biol Macromol.* 2017 Sep;102:380–3.
151. Hu Z, Zhang D-Y, Lu S-T, Li P-W, Li S-D. Chitosan-Based Composite Materials for Prospective Hemostatic Applications. *Mar Drugs.* 2018 Aug 4;16(8):273.
152. Sumy State University, Ukraine, Pogorielov MV, Sikora VZ. Chitosan as a Hemostatic Agent: Current State. *Eur J Med Ser B.* 2015 Mar 12;2(1):24–33.
153. Patrulea V, Ostafe V, Borchard G, Jordan O. Chitosan as a starting material for wound healing applications. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015 Nov;97:417–26.
154. Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar PT, Nair SV, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv.* 2011 May;29(3):322–37.

155. Anraku M, Gebicki JM, Iohara D, Tomida H, Uekama K, Maruyama T, et al. Antioxidant activities of chitosans and its derivatives in in vitro and in vivo studies. *Carbohydr Polym.* 2018 Nov;199:141–9.
156. Ahmad U, Sohail M, Ahmad M, Minhas MU, Khan S, Hussain Z, et al. Chitosan based thermosensitive injectable hydrogels for controlled delivery of loxoprofen: development, characterization and in-vivo evaluation. *Int J Biol Macromol.* 2019 May;129:233–45.
157. Masood N, Ahmed R, Tariq M, Ahmed Z, Masoud MS, Ali I, et al. Silver nanoparticle impregnated chitosan-PEG hydrogel enhances wound healing in diabetes induced rabbits. *Int J Pharm.* 2019 Mar;559:23–36.
158. Essawy HA, Ghazy MBM, El-Hai FA, Mohamed MF. Superabsorbent hydrogels via graft polymerization of acrylic acid from chitosan-cellulose hybrid and their potential in controlled release of soil nutrients. *Int J Biol Macromol.* 2016 Aug;89:144–51.
159. M. Heimbuck A, Priddy-Arrington T, L. Padgett M, B. Llamas C, H. Barnett H, A. Bunnell B, et al. Development of Responsive Chitosan-Genipin Hydrogels for Treatment of Wounds. *ACS Appl Bio Mater.* 2019 Jun 18;
160. Gao L, Gan H, Meng Z, Gu R, Wu Z, Zhu X, et al. Evaluation of genipin-crosslinked chitosan hydrogels as a potential carrier for silver sulfadiazine nanocrystals. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2016 Dec;148:343–53.
161. Liu Y, Kim H-I. Characterization and antibacterial properties of genipin-crosslinked chitosan/poly(ethylene glycol)/ZnO/Ag nanocomposites. *Carbohydr Polym.* 2012 Jun 5;89(1):111–6.
162. Tan H, Chu CR, Payne KA, Marra KG. Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* 2009 May;30(13):2499–506.
163. Mohrman AE, Farrag M, Grimm RK, Leipzig ND. Evaluation of in situ gelling chitosan-PEG copolymer for use in the spinal cord. *J Biomater Appl.* 2018 Sep;33(3):435–46.
164. Obara K, Ishihara M, Ishizuka T, Fujita M, Ozeki Y, Maehara T, et al. Photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2 stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice. *Biomaterials.* 2003 Sep;24(20):3437–44.
165. Ishihara M, Obara K, Ishizuka T, Fujita M, Sato M, Masuoka K, et al. Controlled release of fibroblast growth factors and heparin from photocrosslinked chitosan hydrogels and

- subsequent effect on in vivo vascularization. *J Biomed Mater Res A*. 2003 Mar 1;64(3):551–9.
166. Sakai S, Yamada Y, Zenke T, Kawakami K. Novel chitosan derivative soluble at neutral pH and in-situ gellable via peroxidase-catalyzed enzymatic reaction. *J Mater Chem*. 2009;19(2):230–5.
167. Li G, Guo L, Chang X, Yang M. Thermo-sensitive chitosan based semi-IPN hydrogels for high loading and sustained release of anionic drugs. *Int J Biol Macromol*. 2012 May 1;50(4):899–904.
168. Pellá MCG, Lima-Tenório MK, Tenório-Neto ET, Guilherme MR, Muniz EC, Rubira AF. Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications. *Carbohydr Polym*. 2018 Sep;196:233–45.
169. Racine L, Texier I, Auzély-Velty R. Chitosan-based hydrogels: recent design concepts to tailor properties and functions: Chitosan-based hydrogels: tailoring properties and functions. *Polym Int*. 2017 Jul;66(7):981–98.
170. Nilsen-Nygaard J, Strand S, Vårum K, Draget K, Nordgård C. Chitosan: Gels and Interfacial Properties. *Polymers*. 2015 Mar 13;7(3):552–79.
171. Montembault A, Viton C, Domard A. Rheometric Study of the Gelation of Chitosan in Aqueous Solution without Cross-Linking Agent. *Biomacromolecules*. 2005 Mar;6(2):653–62.
172. Montembault A, Viton C, Domard A. Rheometric study of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium. *Biomaterials*. 2005 May;26(14):1633–43.
173. Luo Y, Wang Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *Int J Biol Macromol*. 2014 Mar;64:353–67.
174. Hamedi H, Moradi S, Hudson SM, Tonelli AE. Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. *Carbohydr Polym*. 2018 Nov;199:445–60.
175. Meka VS, Sing MKG, Pichika MR, Nali SR, Kolapalli VRM, Kesharwani P. A comprehensive review on polyelectrolyte complexes. *Drug Discov Today*. 2017 Nov;22(11):1697–706.
176. Maciel DJ, Ferreira IL de M. Properties evaluation of polyelectrolyte complex based on iota carrageenan and chitosan in acidic and basic media. *Mater Lett*. 2018 Oct;229:142–7.
177. Hanna DH, Saad GR. Encapsulation of ciprofloxacin within modified xanthan gum-chitosan based hydrogel for drug delivery. *Bioorganic Chem*. 2019 Mar;84:115–24.

178. Coutinho DF, Sant S, Shakiba M, Wang B, Gomes ME, Neves NM, et al. Microfabricated photocrosslinkable polyelectrolyte-complex of chitosan and methacrylated gellan gum. *J Mater Chem*. 2012 Jul 31;22(33):17262–71.
179. Vasile C, Pieptu D, Dumitriu RP, Pânzariu A, Profire L. CHITOSAN/HYALURONIC ACID POLYELECTROLYTE COMPLEX HY- DROGELS IN THE MANAGEMENT OF BURN WOUNDS. :7.
180. Mejía EH, Contreras H, Delgado E, Quintana G. Effect of Experimental Parameters on the Formation of Hydrogels by Polyelectrolyte Complexation of Carboxymethylcellulose, Carboxymethyl Starch, and Alginic Acid with Chitosan [Internet]. martel. 2019. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ijce/2019/3085691/>
181. Vasiliu S, Racovita S, Popa M, Ochiuz L, Peptu CA. Chitosan-Based Polyelectrolyte Complex Hydrogels for Biomedical Applications. In: Mondal MdIH, editor. *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 1–31. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-76573-0_56-1
182. Machín R, Isasi JR, Vélaz I. β -Cyclodextrin hydrogels as potential drug delivery systems. *Carbohydr Polym*. 2012 Feb 14;87(3):2024–30.
183. Zhang J, Ma PX. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013 Aug;65(9):1215–33.
184. Loftsson T, Jarho P, Másson M, Järvinen T. Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2005 Mar;2(2):335–51.
185. Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 Dec;3(12):1023–35.
186. van de Manakker F, Vermonden T, van Nostrum CF, Hennink WE. Cyclodextrin-Based Polymeric Materials: Synthesis, Properties, and Pharmaceutical/Biomedical Applications. *Biomacromolecules*. 2009 Dec 14;10(12):3157–75.
187. Irie T, Uekama K. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. III. Toxicological Issues and Safety Evaluation. *J Pharm Sci*. 1997 Feb;86(2):147–62.
188. Kono H, Teshirogi T. Cyclodextrin-grafted chitosan hydrogels for controlled drug delivery. *Int J Biol Macromol*. 2015 Jan;72:299–308.
189. The Three Natural Cyclodextrin: Alpha, Beta, Gamma Cyclodextrin - Company News - News - Zibo Qianhui Biological Technology Co.,Ltd [Internet]. Available from: [http://www.cyclodextrinchina.com/news/the-three-natural-cyclodextrin-alpha-beta-g-](http://www.cyclodextrinchina.com/news/the-three-natural-cyclodextrin-alpha-beta-g)

20557822.html

190. La Recherche – Association Cyclodextrine France [Internet]. Available from: <http://www.clubcyclodextrines.fr/les-cyclodextrines/>
191. Szente L, Szejtli J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. *Adv Drug Deliv Rev.* 1999 Mar 1;36(1):17–28.
192. Morin-Crini N, Crini G. Environmental applications of water-insoluble β -cyclodextrin–epichlorohydrin polymers. *Prog Polym Sci.* 2013 Feb 1;38(2):344–68.
193. Yao X, Huang P, Nie Z. Cyclodextrin-based polymer materials: From controlled synthesis to applications. *Prog Polym Sci.* 2019 Jun;93:1–35.
194. Folch-Cano C, Yazdani-Pedram M, Olea-Azar C. Inclusion and Functionalization of Polymers with Cyclodextrins: Current Applications and Future Prospects. *Molecules.* 2014 Sep 9;19(9):14066–79.
195. Huang F, Gibson HW. Polypseudorotaxanes and polyrotaxanes. *Prog Polym Sci.* 2005 Oct;30(10):982–1018.
196. Gidwani B, Vyas A. Synthesis, characterization and application of epichlorohydrin- β -cyclodextrin polymer. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014 Feb 1;114:130–7.
197. Anne JM, Boon YH, Saad B, Miskam M, Yusoff MM, Shahrman MS, et al. β -Cyclodextrin conjugated bifunctional isocyanate linker polymer for enhanced removal of 2,4-dinitrophenol from environmental waters. *R Soc Open Sci.* 2018 Aug;5(8):180942.
198. Junthip J, Tabary N, Leclercq L, Martel B. Cationic β -cyclodextrin polymer applied to a dual cyclodextrin polyelectrolyte multilayer system. *Carbohydr Polym.* 2015 Aug;126:156–67.
199. Martel B, Ruffin D, Weltrowski M, Lekchiri Y, Morcellet M. Water-soluble polymers and gels from the polycondensation between cyclodextrins and poly(carboxylic acid)s: A study of the preparation parameters. *J Appl Polym Sci.* 2005 Jul 15;97(2):433–42.
200. Liu KL, Zhang Z, Li J. Supramolecular hydrogels based on cyclodextrin–polymer polypseudorotaxanes: materials design and hydrogel properties. *Soft Matter.* 2011;7(24):11290.
201. Li J. Self-assembled supramolecular hydrogels based on polymer–cyclodextrin inclusion complexes for drug delivery. *NPG Asia Mater.* 2010 Jul;2(3):112–8.
202. van de Manakker F, van der Pot M, Vermonden T, van Nostrum CF, Hennink WE. Self-

- Assembling Hydrogels Based on β -Cyclodextrin/Cholesterol Inclusion Complexes. *Macromolecules*. 2008 Mar 1;41(5):1766–73.
203. Osman S, Soliman G, El Rasoul S. Physically Cross-linked Hydrogels of β -cyclodextrin Polymer and Poly(ethylene glycol)-cholesterol as Delivery Systems for Macromolecules and Small Drug Molecules. *Curr Drug Deliv*. 2015 Jul 29;12(4):415–24.
204. Palomino-Durand C, Lopez M, Cazaux F, Martel B, Blanchemain N, Chai F. Influence of the Soluble–Insoluble Ratios of Cyclodextrins Polymers on the Viscoelastic Properties of Injectable Chitosan–Based Hydrogels for Biomedical Application. *Polymers*. 2019 Feb;11(2):214.
205. Granito RN, Custódio MR, Rennó ACM. Natural marine sponges for bone tissue engineering: The state of art and future perspectives: NATURAL MARINE SPONGES FOR BONE TISSUE ENGINEERING. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017 Aug;105(6):1717–27.
206. Costantini M, Barbetta A. Gas foaming technologies for 3D scaffold engineering. In: *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds* [Internet]. Elsevier; 2018. p. 127–49. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081009796000069>
207. Maniglio D, Bonani W, Migliaresi C, Motta A. Silk fibroin porous scaffolds by N₂ O foaming. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2018 Mar 24;29(5):491–506.
208. Poursamar SA, Hatami J, Lehner AN, da Silva CL, Ferreira FC, Antunes APM. Gelatin porous scaffolds fabricated using a modified gas foaming technique: Characterisation and cytotoxicity assessment. *Mater Sci Eng C*. 2015 Mar;48:63–70.
209. Garg T, Singh O, Arora S, Murthy RSR. Scaffold: A Novel Carrier for Cell and Drug Delivery. :64.
210. Mikos AG, Sarakinos G, Leite SM, Vacanti JP, Langer R. Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering. *Biomaterials*. 1993 Apr;14(5):323–30.
211. Raggio R, Bonani W, Callone E, Dirè S, Gambari L, Grassi F, et al. Silk Fibroin Porous Scaffolds Loaded with a Slow-Releasing Hydrogen Sulfide Agent (GYY4137) for Applications of Tissue Engineering. *ACS Biomater Sci Eng*. 2018 Aug 13;4(8):2956–66.
212. Ko C-L, Tien Y-C, Wang J-C, Chen W-C. Characterization of controlled highly porous hyaluronan/gelatin cross-linking sponges for tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2012 Oct;14:227–38.

213. Momin M, Kurhade S, Khanekar P, Mhatre S. Novel biodegradable hydrogel sponge containing curcumin and honey for wound healing. *J Wound Care*. 2016 Jun 2;25(6):364–72.
214. Berretta J, Jennings J, Bumgardner J. Lyophilized Chitosan Sponges. In 2016. p. 239–253.
215. Adams GDJ, Cook I, Ward KR. The Principles of Freeze-Drying. In: Wolkers WF, Oldenhof H, editors. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2015. p. 121–43. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2193-5_4
216. Kasper JC, Friess W. The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011 Jun;78(2):248–63.
217. Annabi N, Nichol JW, Zhong X, Ji C, Koshy S, Khademhosseini A, et al. Controlling the Porosity and Microarchitecture of Hydrogels for Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010 Aug;16(4):371–83.
218. Tang X (Charlie), Pikal MJ. Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice. *Pharm Res*. 2004 Feb;21(2):191–200.
219. Rey L, May JC, editors. *Freeze drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products*. 3rd ed. New York ; London: Informa Healthcare; 2011. 564 p. (Drugs and the pharmaceutical sciences).
220. Ahuja G, Pathak K. Porous Carriers for Controlled/Modulated Drug Delivery. *Indian J Pharm Sci*. 2009;71(6):599–607.
221. Andersson J, Rosenholm J, Areva S, Lindén M. Influences of Material Characteristics on Ibuprofen Drug Loading and Release Profiles from Ordered Micro- and Mesoporous Silica Matrices. *Chem Mater*. 2004 Oct;16(21):4160–7.
222. Wang M, Ma Y, Sun Y, Hong SY, Lee SK, Yoon B, et al. Hierarchical Porous Chitosan Sponges as Robust and Recyclable Adsorbents for Anionic Dye Adsorption. *Sci Rep*. 2017 Dec 22;7(1):18054.
223. Ramli M, Tabassi AA, Hoe KW. Porosity, pore structure and water absorption of polymer-modified mortars: An experimental study under different curing conditions. *Compos Part B Eng*. 2013 Dec 1;55:221–33.
224. Ikeda T, Ikeda K, Yamamoto K, Ishizaki H, Yoshizawa Y, Yanagiguchi K, et al.

Fabrication and Characteristics of Chitosan Sponge as a Tissue Engineering Scaffold. *BioMed Res Int*. 2014;2014:1–8.

225. Lin ASP, Barrows TH, Cartmell SH, Guldberg RE. Microarchitectural and mechanical characterization of oriented porous polymer scaffolds. *Biomaterials*. 2003 Feb;24(3):481–9.

226. Kim U-J, Park J, Joo Kim H, Wada M, Kaplan DL. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. *Biomaterials*. 2005 May;26(15):2775–85.

227. Vedadghavami A, Minooei F, Mohammadi MH, Khetani S, Rezaei Kolahchi A, Mashayekhan S, et al. Manufacturing of hydrogel biomaterials with controlled mechanical properties for tissue engineering applications. *Acta Biomater*. 2017 Oct;62:42–63.

228. McKee CT, Last JA, Russell P, Murphy CJ. Indentation Versus Tensile Measurements of Young's Modulus for Soft Biological Tissues. *Tissue Eng Part B Rev*. 2011 Jun;17(3):155–64.

229. Gil ES, Kluge JA, Rockwood DN, Rajkhowa R, Wang L, Wang X, et al. Mechanical improvements to reinforced porous silk scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2011 Oct;99A(1):16–28.

230. Xu Y, Xia D, Han J, Yuan S, Lin H, Zhao C. Design and fabrication of porous chitosan scaffolds with tunable structures and mechanical properties. *Carbohydr Polym*. 2017 Dec;177:210–6.

231. Zhu W, Pyo S-H, Wang P, You S, Yu C, Alido J, et al. Three-Dimensional Printing of Bisphenol A-Free Polycarbonates. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018 Feb 14;10(6):5331–9.

232. Harris LD, Kim BS, Mooney DJ. Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. *J Biomed Mater Res*. 1998 Dec 5;42(3):396–402.

233. Lin-Gibson S, Cooper JA, Landis FA, Cicerone MT. Systematic Investigation of Porogen Size and Content on Scaffold Morphometric Parameters and Properties. *Biomacromolecules*. 2007 May;8(5):1511–8.

234. Ji C, Shi J. Thermal-crosslinked porous chitosan scaffolds for soft tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C*. 2013 Oct;33(7):3780–5.

235. Cai B, Zhong T, Chen P, Fu J, Jin Y, Liu Y, et al. Preparation, characterization and in vitro release study of drug-loaded sodium carboxy-methylcellulose/chitosan composite sponge. *PLoS ONE [Internet]*. 2018 Oct 22;13(10). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6197682/>

236. Jennings JA, Beenken KE, Parker AC, Smith JK, Courtney HS, Smeltzer MS, et al.

Polymicrobial Biofilm Inhibition Effects of Acetate-Buffered Chitosan Sponge Delivery Device. *Macromol Biosci.* 2016 Apr;16(4):591–8.

237. Pawar V, Bulbake U, Khan W, Srivastava R. Chitosan sponges as a sustained release carrier system for the prophylaxis of orthopedic implant-associated infections. *Int J Biol Macromol.* 2019 Aug;134:100–12.

238. Stinner DJ, Noel SP, Haggard WO, Watson JT, Wenke JC. Local antibiotic delivery using tailorable chitosan sponges: the future of infection control? *J Orthop Trauma.* 2010 Sep;24(9):592–7.

239. Parker AC, Jennings JA, Bumgardner JD, Courtney HS, Lindner E, Haggard WO. Preliminary investigation of crosslinked chitosan sponges for tailorable drug delivery and infection control. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2013 Jan;101B(1):110–23.

240. Noel SP, Courtney HS, Bumgardner JD, Haggard WO. Chitosan Sponges to Locally Deliver Amikacin and Vancomycin: A Pilot In Vitro Evaluation. *Clin Orthop Relat Res.* 2010 Aug;468(8):2074–80.

241. Wu J, Su C, Jiang L, Ye S, Liu X, Shao W. Green and Facile Preparation of Chitosan Sponges as Potential Wound Dressings. *ACS Sustain Chem Eng* [Internet]. 2018 May 30; Available from: <https://pubs-acrs-org.ressources-electroniques.univ-lille.fr/doi/full/10.1021/acssuschemeng.8b01468>

242. Patel N, Hatch D, Wells CM, Ahn D, Harris M, Jennings JA, et al. Characteristics and clinical assessment of antibiotic delivery by chitosan sponge in the high-risk diabetic foot: a case series. *J Wound Care.* 2017 Apr;26(sup4):S32–8.

243. Siafaka PI, Zisi AP, Exindari MK, Karantas ID, Bikiaris DN. Porous dressings of modified chitosan with poly(2-hydroxyethyl acrylate) for topical wound delivery of levofloxacin. *Carbohydr Polym.* 2016 Jun;143:90–9.

244. Parker AC, Beenken KE, Jennings JA, Hittle L, Shirtliff ME, Bumgardner JD, et al. Characterization of local delivery with amphotericin B and vancomycin from modified chitosan sponges and functional biofilm prevention evaluation. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* 2015 Mar;33(3):439–47.

245. Phaechamud T, Charoenteeraboon J. Antibacterial Activity and Drug Release of Chitosan Sponge Containing Doxycycline Hyclate. *AAPS PharmSciTech.* 2008 Jul 15;9(3):829–35.

246. Denkbaş EB, Öztürk E, Özdemir N, Keçecioğlu K, Agalar C. Norfloxacin-loaded Chitosan Sponges as Wound Dressing Material. *J Biomater Appl.* 2004 Apr;18(4):291–303.
247. Wells CM, Beenken KE, Smeltzer MS, Courtney HS, Jennings JA, Haggard WO. Ciprofloxacin and Rifampin Dual Antibiotic-Loaded Biopolymer Chitosan Sponge for Bacterial Inhibition. *Mil Med.* 2018 Mar 1;183(suppl_1):433–44.
248. Landersdorfer CB, Bulitta JB, Kinzig M, Holzgrabe U, Sörgel F. Penetration of antibacterials into bone: pharmacokinetic, pharmacodynamic and bioanalytical considerations. *Clin Pharmacokinet.* 2009;48(2):89–124.
249. Boutoille D. FMC antibiothérapie. 2010;79.
250. Jacqueline C, Caillon J. Impact of bacterial biofilm on the treatment of prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Sep 1;69(suppl_1):i37–40.
251. VIDAL - Ciprofloxacin [Internet]. Available from: <https://www.vidal.fr/substances/4070/ciprofloxacin/>
252. Dorosz P, Vital Durand D, Le Jeune C, editors. *Guide pratique des médicaments* Maloine. 31. éd. Paris: Maloine; 2011. 1877 p.
253. VIDAL - Rifampicine [Internet]. Available from: <https://www.vidal.fr/substances/3060/rifampicine/>
254. Martin A, Tabary N, Leclercq L, Junthip J, Degoutin S, Aubert-Viard F, et al. Multilayered textile coating based on a β -cyclodextrin polyelectrolyte for the controlled release of drugs. *Carbohydr Polym.* 2013 Apr;93(2):718–30.
255. Martin A, Tabary N, Chai F, Leclercq L, Junthip J, Aubert-Viard F, et al. Build-up of an antimicrobial multilayer coating on a textile support based on a methylene blue–poly(cyclodextrin) complex. *Biomed Mater.* 2013 Nov 26;8(6):065006.
256. Aubert-Viard F. Conception et évaluation d'un pansement multicouche antibactérien pour le traitement des plaies chroniques.
257. Mogrovejo-Valdivia A, Rahmouni O, Tabary N, Maton M, Neut C, Martel B, et al. In vitro evaluation of drug release and antibacterial activity of a silver-loaded wound dressing coated with a multilayer system. *Int J Pharm.* 2019 Feb;556:301–10.
258. Mogrovejo-Valdivia A. Conception et évaluation d'un pansement à libération de deux principes actifs pour le traitement des plaies chroniques. Université de Lille;

259. Pérez-Anes A, Gargouri M, Laure W, Van Den Berghe H, Courcot E, Sobocinski J, et al. Bioinspired Titanium Drug Eluting Platforms Based on a Poly- β -cyclodextrin–Chitosan Layer-by-Layer Self-Assembly Targeting Infections. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015 Jun 17;7(23):12882–93.
260. Ouerghemmi S, Degoutin S, Tabary N, Cazaux F, Maton M, Gaucher V, et al. Triclosan loaded electrospun nanofibers based on a cyclodextrin polymer and chitosan polyelectrolyte complex. *Int J Pharm*. 2016 Nov;513(1–2):483–95.
261. Blanchemain N, Martel B, Flores C, Cazaux F, Chai F, Tabary N. Method for the Production of Hydrogel Comprising Chitosan and Negatively Charged Polyelectrolytes, and Cellular, Porous Material Resulting from Said Hydrogel [Internet]. FR3038318 (A1), 2017. Available from:
https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?FT=D&date=20170106&DB=&locale=fr_EP&CC=FR&NR=3038318A1&KC=A1&ND=1
262. Weltrowski M, Morcellet M, Martel B. Polymeres de cyclodextrine(s) et/ou derives de cyclodextrine(s) presentant des proprietes complexantes et echangeuses d'ions et leur procede de fabrication [Internet]. WO2000047630A1, 2000. Available from:
<https://patents.google.com/patent/WO2000047630A1/fr>
263. Ciprofloxacin PHR1167 [Internet]. Sigma-Aldrich. Available from:
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/phr1167>
264. Rifampicin. In: Wikipedia [Internet]. 2019. Available from:
<https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Rifampicin&oldid=912252339>
265. Raghavan SR, Cipriano BH. Gel Formation: Phase Diagrams Using Tabletop Rheology and Calorimetry. In: Weiss RG, Terech P, editors. *Molecular Gels: Materials with Self-Assembled Fibrillar Networks* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2006. p. 241–52. Available from: https://doi.org/10.1007/1-4020-3689-2_9
266. Endogan Tanir T, Hasirci V, Hasirci N. Preparation and characterization of Chitosan and PLGA-based scaffolds for tissue engineering applications. *Polym Compos*. 2015 Oct;36(10):1917–30.
267. alamarBlue Cell Viability Reagent - Thermo Fisher Scientific [Internet]. Available from:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/DAL1025?SID=srch-srp-DAL1025>
268. Roy JC, Salaün F, Giraud S, Ferri A, Chen G, Guan J. Solubility of Chitin: Solvents,

- Solution Behaviors and Their Related Mechanisms. In: Xu Z, editor. Solubility of Polysaccharides [Internet]. InTech; 2017. Available from: <http://www.intechopen.com/books/solubility-of-polysaccharides/solubility-of-chitin-solvents-solution-behaviors-and-their-related-mechanisms>
269. Fatimi A, Tassin J-F, Turczyn R, Axelos MAV, Weiss P. Gelation studies of a cellulose-based biohydrogel: The influence of pH, temperature and sterilization. *Acta Biomater.* 2009 Nov;5(9):3423–32.
270. Anraku M, Iohara D, Hiraga A, Uekama K, Ifuku S, Pipkin JD, et al. Formation of Elastic Gels from Deacetylated Chitin Nanofibers Reinforced with Sulfobutyl Ether β -Cyclodextrin. *Chem Lett.* 2015 Mar 5;44(3):285–7.
271. Jin R, Moreira Teixeira LS, Dijkstra PJ, Karperien M, van Blitterswijk CA, Zhong ZY, et al. Injectable chitosan-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* 2009 May;30(13):2544–51.
272. Arslan M, Yirmibesoglu T, Celebi M. In situ Crosslinkable Thiol-ene Hydrogels Based on PEGylated Chitosan and β -Cyclodextrin. *J Turk Chem Soc Sect Chem.* 2018 Nov 23;1327–36.
273. Rogina A. Cellular hydrogels based on pH-responsive chitosan-hydroxyapatite system. :30.
274. Ji C, Shi J. Thermal-crosslinked porous chitosan scaffolds for soft tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C.* 2013 Oct;33(7):3780–5.
275. Peniche C, Elvira C, San Roman J. Interpolymer complexes of chitosan and polymethacrylic derivatives of salicylic acid: preparation, characterization and modification by thermal treatment. *Polymer.* 1998 Dec 1;39(25):6549–54.
276. Bernabé P, Peniche C, Argüelles-Monal W. Swelling behavior of chitosan/pectin polyelectrolyte complex membranes. Effect of thermal cross-linking. *Polym Bull.* 2005 Nov;55(5):367–75.
277. Aubert-Viard F, Mogrovejo-Valdivia A, Tabary N, Maton M, Chai F, Neut C, et al. Evaluation of antibacterial textile covered by layer-by-layer coating and loaded with chlorhexidine for wound dressing application. *Mater Sci Eng C.* 2019 Jul;100:554–63.
278. Herbois R, Noël S, Léger B, Tilloy S, Manuel S, Addad A, et al. Ruthenium-containing β -cyclodextrin polymer globules for the catalytic hydrogenation of biomass-derived furanic

- compounds. *Green Chem.* 2015;17(4):2444–54.
279. Carbinatto FM, de Castro AD, Evangelista RC, Cury BSF. Insights into the swelling process and drug release mechanisms from cross-linked pectin/high amylose starch matrices. *Asian J Pharm Sci.* 2014 Feb 1;9(1):27–34.
280. Ratner BD, editor. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine.* 3rd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press; 2013. 1519 p.
281. Carter GF, Paul DE. *Materials science & engineering.* Materials Park, Ohio: ASM International; 1991. 351 p.
282. Kitahara H, Okada K, Kimura T, Yock PG, Lansky AJ, Popma JJ, et al. Impact of Stent Size Selection on Acute and Long-Term Outcomes After Drug-Eluting Stent Implantation in De Novo Coronary Lesions. *Circ Cardiovasc Interv.* 2017 Oct;10(10).
283. Pernès J-M. Les stents traditionnels modernes : de nouveaux concepts. *J Mal Vasc.* 2015 Mar 1;40(2):92–3.
284. Gibson LJ, Ashby MF. *Cellular solids: structure and properties.* 2. ed., 1. paperback ed. (with corr.), transferred to digital printing. Cambridge: Cambridge Univ. Press; 2001. 510 p. (Cambridge solid state science series).
285. Xing Liang, Boppart SA. Biomechanical Properties of *In Vivo* Human Skin From Dynamic Optical Coherence Elastography. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2010 Apr;57(4):953–9.
286. Garcia-Fernandez MJ, Maton M, Benzine Y, Tabary N, Baptiste EJ, Gargouri M, et al. Ciprofloxacin loaded vascular prostheses functionalized with poly-methylbeta- cyclodextrin: The importance of in vitro release conditions. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2019 Oct 1;53:101166.
287. Blanchemain N, Karrouy Y, Tabary N, Neut C, Bria M, Siepmann J, et al. Methyl- β -cyclodextrin modified vascular prosthesis: Influence of the modification level on the drug delivery properties in different media. *Acta Biomater.* 2011 Jan 1;7(1):304–14.
288. Masoumi S, Amiri S, Bahrami SH. PCL-based nanofibers loaded with ciprofloxacin/cyclodextrin containers. *J Text Inst.* 2018 Aug 3;109(8):1044–53.
289. Aytac Z, Ipek S, Erol I, Durgun E, Uyar T. Fast-dissolving electrospun gelatin nanofibers encapsulating ciprofloxacin/cyclodextrin inclusion complex. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019 Jun;178:129–36.
290. Ferreira DA, Ferreira AG, Vizzotto L, Federman Neto A, Oliveira AG de. Analysis of the

molecular association of rifampicin with hydroxypropyl-²-cyclodextrin. *Rev Bras Cienc Farm.* 2004 Mar;43–51.

291. Chadha R, Saini A, Gupta S, Arora P, Thakur D, Jain DVS. Encapsulation of rifampicin by natural and modified β -cyclodextrins: characterization and thermodynamic parameters. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2010 Jun;67(1–2):109–16.

292. He D, Deng P, Yang L, Tan Q, Liu J, Yang M, et al. Molecular encapsulation of rifampicin as an inclusion complex of hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Design; characterization and in vitro dissolution. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013 Mar;103:580–5.

293. Thatiparti TR, von Recum HA. Cyclodextrin Complexation for Affinity-Based Antibiotic Delivery. *Macromol Biosci.* 2010 Jan 11;10(1):82–90.

294. Laabd M, Jaouhari AE, Chafai H, Aarab N, Albourine A. Etude cinétique et thermodynamique de l'adsorption des colorants monoazoïques sur la polyaniline (Title). 2015;11.

295. Ho YS, McKay G. Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochem.* 1999 Jul 1;34(5):451–65.

296. Vermet G, Degoutin S, Chai F, Maton M, Flores C, Neut C, et al. Cyclodextrin modified PLLA parietal reinforcement implant with prolonged antibacterial activity. *Acta Biomater.* 2017 Apr;53:222–32.

297. Howes BD, Guerrini L, Sanchez-Cortes S, Marzocchi MP, Garcia-Ramos JV, Smulevich G. The influence of pH and anions on the adsorption mechanism of rifampicin on silver colloids. *J Raman Spectrosc.* 2007 Jul;38(7):859–64.

298. Tewes F, Brillault J, Couet W, Olivier J-C. Formulation of rifampicin–cyclodextrin complexes for lung nebulization. *J Controlled Release.* 2008 Jul;129(2):93–9.

299. Taha M. Evaluation of sorption capacity of antibiotics and antibacterial properties of a cyclodextrin-polymer functionalized hydroxyapatite-coated titanium hip prosthesis. *Int J Pharm.* 2014;10.

300. Wootton R, Reeve J, Veall N. Measurement of Skeletal Blood Flow in Normal Man and in Patients with Paget's Disease of Bone. In: Nielsen SP, Hjørting-Hansen E, editors. *Calcified Tissues 1975* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1976. p. 380–5. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-29272-3_60

301. Liu J, Viverette T, Virgin M, Anderson M, Dalal P. A Study of the Impact of Freezing on

the Lyophilization of a Concentrated Formulation with a High Fill Depth. *Pharm Dev Technol*. 2005 May 1;10(2):261–72.

302. Ali SQ, Zehra A, Naqvi BS, Shah S, Bushra R. Resistance Pattern of Ciprofloxacin Against Different Pathogens. *Oman Med J*. 2010 Oct;25(4):294–8.

303. Wehrli W. Rifampin: Mechanisms of Action and Resistance. *Clin Infect Dis*. 1983 Jul 1;5(Supplement_3):S407–11.

304. Prajapati JD, Fernández Solano CJ, Winterhalter M, Kleinekathöfer U. Characterization of Ciprofloxacin Permeation Pathways across the Porin OmpC Using Metadynamics and a String Method. *J Chem Theory Comput*. 2017 Sep 12;13(9):4553–66.

305. Bazile S, Moreau N, Bouzard D, Essiz M. Relationships among antibacterial activity, inhibition of DNA gyrase, and intracellular accumulation of 11 fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992 Dec 1;36(12):2622–7.

306. Nikaido H, Rosenberg EY, Foulds J. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with beta-lactams in intact cells. *J Bacteriol*. 1983 Jan;153(1):232–40.

307. LeBel M. Ciprofloxacin: Chemistry, Mechanism of Action, Resistance, Antimicrobial Spectrum, Pharmacokinetics, Clinical Trials, and Adverse Reactions. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther*. 1988 Jan 2;8(1):3–30.

308. Sharma D, Patel RP, Zaidi STR, Sarker MMR, Lean QY, Ming LC. Interplay of the Quality of Ciprofloxacin and Antibiotic Resistance in Developing Countries. *Front Pharmacol* [Internet]. 2017;8. Available from:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2017.00546/full>

309. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry*. 2014 Mar 18;53(10):1565–74.

310. Mustaev A, Malik M, Zhao X, Kurepina N, Luan G, Oppegard LM, et al. Fluoroquinolone-Gyrase-DNA Complexes. *J Biol Chem*. 2014 May 2;289(18):12300–12.

311. Williams K. Accumulation of rifampicin by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*. 1998 Nov 1;42(5):597–603.

312. Okusu H, Ma D, Nikaido H. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J Bacteriol*. 1996 Jan 1;178(1):306–8.

313. Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, et al.

Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell*. 2001 Mar 23;104(6):901–12.

314. D'Costa V, Wright GD. Biochemical Logic of Antibiotic Inactivation and Modification. In: Mayers DL, editor. *Antimicrobial Drug Resistance* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2009. p. 81–95. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-180-2_8

315. 2015-MAP-fluoroquinolones-SPLIF.pdf.

316. Auboyer C, Beaucaire G, Drugeon H, Gouin F, Granry JC, Jarlier V, et al. Associations d'antibiotiques ou monothérapie en réanimation chirurgicale et en chirurgie. *Réanimation Urgences*. 2000 Jul;9(4):305–10.

317. Stengel D, Bauwens K, Sehouli J, Ekkernkamp A, Porzolt F. Systematic review and meta-analysis of antibiotic therapy for bone and joint infections. *Lancet Infect Dis*. 2001 Oct;1(3):175–88.

318. Malanovic N, Lohner K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 2016 May 1;1858(5):936–46.

319. Brown S, Santa Maria JP, Walker S. Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 2013;67. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3883102/>

320. No HK, Young Park N, Ho Lee S, Meyers SP. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol*. 2002 Mar 25;74(1):65–72.

321. Silva L, Britto D, Selegim M, Assis O. In vitro activity of water-soluble quaternary chitosan chloride salt against *E. coli*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2010 Nov 1;26:2089–92.

322. Goy RC, Morais STB, Assis OBG. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. *Rev Bras Farmacogn*. 2016 Jan 1;26(1):122–7.

323. Sudarshan NR, Hoover DG, Knorr D. Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnol*. 1992 Jan 1;6(3):257–72.

324. Eaton P, Fernandes JC, Pereira E, Pintado ME, Xavier Malcata F. Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ultramicroscopy*. 2008 Sep;108(10):1128–34.

325. Markakis K, Faris AR, Sharaf H, Faris B, Rees S, Bowling FL. Local Antibiotic Delivery Systems: Current and Future Applications for Diabetic Foot Infections. *Int J Low Extrem Wounds*. 2018 Mar;17(1):14–21.
326. A Practical Method for Resolving the Nucleation Problem in Lyophilization [Internet]. BioProcess International. 2009. Available from: <https://bioprocessintl.com/manufacturing/formulation/a-practical-method-for-resolving-the-nucleation-problem-in-lyophilization-185124/>
327. Passot S, Tréléa IC, Marin M, Galan M, Morris GJ, Fonseca F. Effect of controlled ice nucleation on primary drying stage and protein recovery in vials cooled in a modified freeze-dryer. *J Biomech Eng*. 2009 Jul;131(7):074511.
328. Petrofsky JS. The Effect of Type-2-Diabetes-Related Vascular Endothelial Dysfunction on Skin Physiology and Activities of Daily Living. *J Diabetes Sci Technol*. 2011 May;5(3):657–67.
329. Petrofsky JS, Bains GS, Prowse M, Mc Lellan K, Ethiraju G, Lee S, et al. The influence of age and diabetes on the skin blood flow response to local pressure. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2009 Jul;15(7):CR325-331.
330. Chin NX, Neu HC. Post-antibiotic suppressive effect of ciprofloxacin against gram-positive and gram-negative bacteria. *Am J Med*. 1987 Apr;82(4A):58–62.
331. Minguez F, Ramos C, Barrientos S, Loscos A, Prieto J. Postantibiotic Effect of Ciprofloxacin Compared with that of Five Other Quinolones. *Chemotherapy*. 1991;37(6):420–5.
332. Tellis M, Joseph J, Khande H, Bhagwat S, Patel M. In vitro bactericidal activity of levonadifloxacin (WCK 771) against methicillin- and quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Med Microbiol*. 2019 Aug 1;68(8):1129–36.
333. Vatan A, Saltoglu N, Yemisen M, Balkan II, Surme S, Demiray T, et al. Association between biofilm and multi/extensive drug resistance in diabetic foot infection. *Int J Clin Pract*. 2018 Mar;72(3):e13060.
334. Neut D, Tijdens-Creusen EJ, Bulstra SK, van der Mei HC, Busscher HJ. Biofilms in chronic diabetic foot ulcers—a study of 2 cases. *Acta Orthop*. 2011 Jun;82(3):383–5.
335. Nunan R, Harding KG, Martin P. Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. *Dis Model Mech*. 2014

Nov;7(11):1205–13.

Communications

Communications orales

- A. Gauzit Amiel, C. Palomino, M. Lopez, M. Maton, F. Cazaux, F. Chai, C. Neut, B. Martel, B. Foligne, N. Blanchemain. Chitosan-polycyclodextrin physical sponge for anti-infectious drug release device. *5th European Cyclodextrin Conference*. Lisbonne, Portugal. **2017**
- C. Palomino-Durand, A. Gauzit-Amiel, M. Lopez, F. Cazaux, B. Martel, N. Blanchemain, F. Chai. Chitosan/poly-cyclodextrin hydrogels and sponges for bone tissue engineering application. *17e Journee Andre VERBERT - Colloque Annuel des Doctorants*. Lille, France. **2017**.
- C. Palomino-Durand, A. Gauzit-Amiel, M. Lopez, F. Cazaux, B. Martel, N. Blanchemain, F. Chai. Chitosan/poly-cyclodextrin hydrogels and sponges for bone tissue engineering application. *SINAPSIS 2017. II Encuentro de cientificos persuanos en Europa*. Berlin, Germany. **2017**
- C. Palomino-Durand, A. Gauzit-Amiel, M. Lopez, F. Cazaux, B. Martel, N. Blanchemain, F. Chai. Effect of the molecular weight of chitosan on the properties of the chitosan/poly-cyclodextrin hydrogels and sponges for bone tissue engineering. *2nd BIOMAT Congress*. Ambleteuse, France. **2017**
- A. Gauzit Amiel, C. Palomino-Durand, M. Lopez, M. Maton, F. Cazaux, F. Chai, C. Neut, B. Foligne, B. Martel, N. Blanchemain. Ciprofloxacin loaded sponges (Chitosan/Cyclodextrin polymer) for bone infection treatment. *ICS 2018 - 19th International Cyclodextrin Symposium*. Tokyo, Japon. **2018**.
- A. Gauzit Amiel, C. Palomino-Durand, M. Maton¹ M. Lopez, C. Neut, B. Foligné, B. Martel, N. Blanchemain. Antibacterial sponge as a local drug delivery device for the treatment of diabetic foot infection – Impact of Thermal Treatment. *Biomat, La grande Motte*. France. **2019**

Communications par affiche

- Gauzit-Amiel, C. Palomino-Durand, M. Lopez, M. Maton, F. Cazaux, F. Chai, C. Neut, B. Martel, N. Blanchemain. Ciprofloxacin loaded sponges (Chitosan/Cyclodextrin polymer) for bone infection. *2nd BIOMAT Congress*. Ambleteuse, France. **2017**

- Gauzit Amiel, C. Palomino-Durand, M. Lopez, M. Maton, F. Cazaux, F. Chai, B. Foligné, C. Neut, B. Martel, N. Blanchemain. Ciprofloxacin loaded sponge (Chitosan / Cyclodextrin polymer) for bone infection treatment. *29TH European conference on biomaterials*. Athènes, Grèce. **2017**
- Gauzit Amiel, C. Palomino-Durand, M. Lopez, M. Maton, F. Cazaux, F. Chai, B. Foligné, C. Neut, B. Martel, N. Blanchemain. Physical sponge based on chitosan and poly- β -cyclodextrin as an antibacterial drug release device. *ESB 2018 - 29th Annual Meeting of the European Society for Biomaterials*. Maastricht. Pays bas. **2018**
- C. Palomino-Durand, A. Gauzit-Amiel, M. Lopez, F. Cazaux, B. Martel, N. Blanchemain, F. Chai. Development of chitosan/poly- β -cyclodextrin sponges for bone tissue engineering application. *ESB 2018 - 29th Annual Meeting of the European Society for Biomaterials*. Maastricht. Pays bas. **2018**
- A. Gauzit Amiel, C. Palomino-Durand, M. Lopez, M. Maton, F. Cazaux, F. Chai, B. Foligné, C. Neut, B. Martel, N. Blanchemain. A physical sponge of chitosan and polycyclodextrin for anti-bacterial drug release device. *2^{ème} journée Recherche de la faculté de Pharmacie*. Lille, France. **2018**
- C. Palomino-Durand, A. Gauzit-Amiel, M. López, F. Cazaux, B. Martel, N. Blanchemain, F. Chai. Development of chitosan/poly-cyclodextrin hydrogels and sponges for bone tissue engineering application. *2^{ème} journée Recherche de la faculté de Pharmacie*. Lille, France. **2018**
- A. Gauzit Amiel, C. Palomino-Durand, M. Lopez, M. Maton, F. Cazaux, F. Chai, B. Foligné, C. Neut, B. Martel, N. Blanchemain. A physical sponge of chitosan and polycyclodextrin for anti-bacterial drug release device. *THERMEC 2018. International Conference on Processing & Manufacturing of Advanced Materials*. Paris, France. **2018**
- C. Palomino-Durand, A. Gauzit-Amiel, M. López, F. Cazaux, B. Martel, N. Blanchemain, F. Chai. Development of chitosan/poly-cyclodextrin hydrogels and sponges for bone tissue engineering application. *THERMEC 2018. International Conference on Processing & Manufacturing of Advanced Materials*. Paris, France. **2018**

Résumé

Les infections du pied diabétique sont la complication la plus fréquente nécessitant l'hospitalisation des patients atteints de diabète. Ces infections sont la conséquence de plusieurs complications liées à l'hyperglycémie chronique. C'est aussi l'évènement le plus commun amenant à une amputation des extrémités. Elles sont associées à une morbi-mortalité très élevée, particulièrement quand l'os est infecté. Leur prise en charge est lourde, longue avec un risque de rechute important. Leur traitement repose sur des actes chirurgicaux, des soins infirmiers et une antibiothérapie par voie systémique. Les artériopathies dont souffrent les patients diabétiques et les tissus nécrosés mal vascularisés entourant les plaies engendrent une mauvaise pénétrance des antibiotiques au site infecté, avec de possible sélections de résistances bactériennes. Ces infections sont donc particulièrement difficiles à soigner. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est de développer un dispositif médical pour la libération locale d'antibiotiques. Ce dispositif consiste en une éponge conçue à base de deux polyélectrolytes, obtenue par lyophilisation. Le chitosan est un polymère cationique en condition acide et le polymère de cyclodextrines est anionique et résulte d'une réaction de réticulation entre les cyclodextrines et l'acide citrique. Les cyclodextrines sont des molécules cages capables de former des complexes d'inclusion avec des principes actifs. Ces complexes permettent de libérer les médicaments de façon prolongée. Les éponges sont imprégnées dans des solutions d'antibiotiques et sont destinées à être implantées dans la lésion infectée. La libération locale permet d'augmenter les concentrations au niveau de la plaie sans risque de toxicité pour l'organisme et évite l'émergence de bactéries résistantes.

Mots clés : infection du pied diabétique, chitosan, polymère de cyclodextrines, complexe de polyélectrolytes

Abstract

Diabetic foot infections are the most common complication requiring hospitalization of patients with diabetes. These infections are the result of many complications related to chronic hyperglycemia. They often result in extremities amputation and are associated with a high morbidity, especially when bone is infected. Their treatment is based on surgical procedures, nursing care and systemic antibiotic therapy for several weeks, with a significant risk of relapse. Because of a basic low blood flow and diabetic foot infections damages, blood supply is decreased causing a low antibiotic diffusion in the infected site and possible bacterial resistance selections. Therefore, they are particularly difficult to treat. In this context, the objective of this work is to develop a medical device for a local antibiotics release. We designed a sponge based on two polyelectrolytes (chitosan and cyclodextrin polymer) and obtained by freeze-drying. Chitosan is a cationic polymer under acid condition and the cyclodextrin polymer is anionic and results from the crosslinking reaction between cyclodextrins and citric acid. Cyclodextrins are molecular cages able to form inclusion complexes with drugs, leading to an extended release. Sponges are impregnated in antibiotics solutions and are intended to be implanted in the infected lesion. Local release increases concentrations in the wound without risks of toxicity to the body and prevents the emergence of resistant bacteria.

Keywords: diabetic foot infection, chitosan, cyclodextrin polymer, polyelectrolyte complex