



Université des Sciences et Technologies de Lille

Ecole Doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

Thèse

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille

Molécules et Matière Condensée

Présentée et soutenue par

Adeline MARTIN

Le 11 Octobre 2013

Dépôt de film multicouche sur surface textile pour la libération prolongée de principes actifs

Pr. Bernard MARTEL (UMET – Lille 1)

Dr. Nicolas TABARY (UMET – Lille 1)

Directeur

Co-encadrant

Membres du Jury :

Dr. Fouzia BOULMEDAIS (ICS – Strasbourg)

DR. André DERATANI (IEM – Montpellier 2)

Dr. Nicolas BLANCHEMAIN (U1008 – Lille 2)

Dr. David FOURNIER (UMET – Lille 1)

DR. Ruxandra GREF (CNRS – Paris Sud)

Dr. Laurent LECLERCQ (IBMM – Montpellier 1)

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Examineur



Université des sciences et technologies de Lille

Ecole Doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

Thèse

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille

Molécules et Matière Condensée

Présentée et soutenue par

Adeline MARTIN

Le 11 octobre 2013

Dépôt de film multicouche sur surface textile pour la libération
prolongée de principes actifs

Pr. Bernard MARTEL (UMET – Lille 1)

Dr. Nicolas TABARY (UMET – Lille 1)

Directeur

Co-encadrant

Membres du Jury :

Dr. Fouzia BOULMEDAIS (ICD – Strasbourg)

DR. André DERATANI (IEM – Montpellier 2)

Dr. Nicolas BLANCHEMAIN (U1008 – Lille 2)

Dr. David FOURNIER (UMET – Lille 1)

DR. Ruxandra GREF (CNRS – Paris Sud)

Dr. Laurent LECLERCQ (IBMM – Montpellier 1)

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Examineur

*"L'important arrive non pas au terme de la route, mais bien avant,
pendant le trajet lui-même."*

Milorad Pavic

Remerciements

Je remercie Mr le Président de l'Université de Lille 1, Sciences et technologies d'avoir soutenu ce projet par l'octroi d'une allocation de recherche à l'équipe du Pr Martel.

Je suis très sensible à l'honneur que me font :

***Mme Fouzia BOULMEDAIS**, Chargée de Recherche à l'Institut Charles Sadron de Strasbourg,
Mr. David FOURNIER, Maître de Conférence à l'Unité Matériaux Et Transformations de Lille 1,
Mme Ruxandra GREF, Directeur de recherche à la Faculté de Pharmacie de Châtenay Malabry,
Mr André DERATANI, Directeur de recherche à l'Institut Européen des Membranes de Montpellier 2*

d'accepter de juger mon travail, j'espère être à la hauteur de leurs attentes.

Grâce à la pluridisciplinarité de ce projet, j'ai eu le plaisir de côtoyer de nombreuses personnes, d'horizons différents et je ne peux que me réjouir de toutes ces rencontres. Je dois reconnaître que je suis arrivée dans le Nord avec une certaine appréhension, et quelques aprioris. Si mes doutes sur le climat se sont malheureusement confirmés, vous avez su balayer tous les autres par votre gentillesse, disponibilité, humour etc... La découverte de cette région et de son terroir, aura d'ailleurs achevé de me convaincre ! J'espère n'oublier personne dans ces pages.

*En premier lieu mes remerciements vont au **Pr. Bernard MARTEL**, mon Directeur de thèse, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche et m'avoir fait confiance sans jamais m'avoir rencontrée auparavant ; mais aussi pour sa bonne humeur, son humour et ses qualités humaines. Merci d'avoir su détecter mon amour des voyages et de m'avoir permis de présenter mes travaux dans de nombreux congrès nationaux et internationaux.*

*Je souhaiterai tout particulièrement remercier le **Dr. Nicolas TABARY**, pour avoir été un co-encadrant si disponible et bienveillant, avec toutes les contraintes que cela sous-entend. Je pense que nous avons su exploiter au mieux nos différences pour former une équipe redoutable (surtout pour les buffets!). Je suis très fière d'avoir été ta première thésarde, et j'espère secrètement que les suivants ne seront jamais à la hauteur... ¡Voy a echar de menos los cursos de Español !*

*Une collaboration avec l'IBMM de Montpellier m'a permis de travailler avec le **Dr. Laurent LECLERCQ**. Merci pour toutes ces manip d'OWLS, pour votre gentillesse et votre disponibilité à*

répondre à mes nombreuses questions par mails interposés mais aussi votre patience et rapidité à la correction des articles et du manuscrit.

*Je salue chaleureusement toute l'équipe du GRB, en particulier **Feng CHAI** et le **Dr. Nicolas BLANCHEMAIN**, pour leur aide concernant les manipulation de biologie et pour m'avoir permis d'en réaliser certaines par moi-même. Les conversations scientifiques que l'on a pu avoir m'ont beaucoup apporté, aussi bien vis-à-vis de ma thèse que de mon projet professionnel.*

*Je ne pourrais évidemment pas oublier d'y inclure **Mickaël MATON**, pour sa disponibilité, sa pédagogie, sa patience et sa bonne humeur. La microbiologie n'a jamais été aussi divertissante et je suis fier d'avoir réussi certaines de ces manip périlleuses par moi-même, sous la houlette d'un si bon professeur. Merci également pour toutes les « initiatives culturelles », à Lille et ailleurs... !*

*Je n'aurais pas pu souhaiter mieux pour effectuer mon enseignement, que les TP du **Dr. Frédéric Cazaux**. Merci de m'avoir formée et supportée pendant les trois années consécutives de mon monitorat. J'ai beaucoup appris, et les blagues vont assurément me manquer...*

*A **Cécile**, compagne d'infortune, colocataire de bureau, collègue de labo, camarade de conversations lunaires et amie. Si les affres de l'administration ont suffi à nous rapprocher dès le début, nos goûts culinaires et télévisuels communs, l'amour du rose, les congrès et formations qu'on n'oubliera pas de sitôt, sans oublier notre indéniable capacité à rendre n'importe quel sujet intéressant, auront permis de rendre ces trois années particulièrement trépidantes ! Il va être difficile de trouver des collègues plus compatibles... Merci beaucoup et bon courage, ton tour vient !*

*Muchas gracias **Dr. Alexandra PEREZ-ANES**. Tu repartiste nos oficina durante menos que una año pero tu trajiste tan rosa en nos vidas, tanto en sentido literal como figurado. Si empecé los cursos de Español, es gracias a ti, y estaría eternamente agradecido.*

*Merci à tous les thésards encore au labo, partis vers d'autres horizons ou qui n'ont été que de passages - **Camille, Léna, Maria, Aurélie, Claudia, William, Khaled, François, Jatupol, Guillaume, Cédric, Jacobo** - et à l'ensemble du personnel de l'UMET et du GRB, qui ont tous indéniablement contribués à la bonne ambiance de tous les jours. Je voudrais aussi remercier tous les stagiaires qui ont permis de faire avancer ce projet et surtout, qui en ont construit des couches !*



Il est rare de pouvoir faire des déclarations d'amour officielles aux personnes qui comptent, alors j'aimerai profiter de cette tribune, pour présenter toute ma gratitude aux irremplaçables soutiens que j'ai eu la chance d'avoir à mes côtés, au cours de ces 3 années.

*Merci à mes rencontres lilloises : **(Dr.) Maryska** - pour tous les nouveaux restos qu'on a pu tester et de m'avoir rassuré sur le fait que non, la rédaction, ça n'est pas si terrible ! – et **Laurent** pour tous ces moments et folles soirées. **Carla y Julien** (y Cassis), muchas gracias por todo, los clasas de Español y los noches de juegos también. Creo que la cultura española trajo alegría en mi vida.*

*A la bande alsacienne des années lycées, **Marie-Noëlle, Flo, Mat, Max, Julio, Baba, Bert** et à **Anne, Cathy & David**, pour avoir toujours été présents quand je rentrais me ressourcer! Spéciale dédicace à **Jérôme**. Tu as été mon binôme de TP au lycée et depuis, tu n'as cessé d'être à l'écoute de mes vagues à l'âme, même par Facetime. Je n'ai qu'une chose à te dire : Kiss BB.*

*A **Hervé**, au meilleur ami qu'on puisse rêver d'avoir, qui partage avec moi, non seulement ce caractère d'optimisme et d'émerveillement mais aussi ce goût, sorti d'on ne sait où, pour les belles (chères !) choses. Ne change jamais et, tu le sais, « You and I, we'll be young forever ! ».*

*Je souhaiterai ici rendre un hommage particulier à toutes les grosses : **Cléclette, Eugène, Ju, Marig, Momo et Valoch**'. Grâce à vous, je ne connais plus l'ennui, ma boîte mail est toujours pleine et je n'ai jamais autant rentabilisé ma carte 12-25 ! Vous m'avez permis de passer ces trois années de la meilleure manière qui soit, ponctuées de séjours ici et là pour découvrir de nouvelles villes françaises, européennes ou même mondiales, et n'hésitant pas, à toujours me soutenir dans les moments moins faciles. Nous sommes la preuve, s'il en fallait, que les grandes amitiés peuvent survivre au-delà des continents et des fuseaux horaires ! En espérant qu'elle durera encore assez longtemps pour nous valoir un reportage sur M6...*

*Mention spéciale à **Marig**, ma correctrice de choc ! Merci d'avoir pris le temps de relire ces quelques 200 pages, et d'avoir su repérer les coquilles que seul ton œil avisé pouvait trouver.*

*Je tiens finalement à remercier toute ma famille. A **Tata Michèle** et **Mimi**, pour m'avoir permis d'être parisienne le temps de nombreux week-ends et plus particulièrement à **Cora, Sève, Olive, Mutti et Vati**. Merci pour votre amour inconditionnel et votre soutien indéfectible et ce, quel que soit les projets fous que j'entreprends ! Il n'y a pas de plus grande chance au monde que de démarrer sa vie dans un cercle aussi solide et, je crois que quand on a une famille aussi formidable que la nôtre, il n'y a pas d'obstacles insurmontables.*

Table des matières

Remerciements.....	2
Principales abréviations utilisées	10
Introduction Générale.....	12
PARTIE I : Étude Bibliographique.....	16
I. Dispositifs médicaux textiles et traitement de surface	18
I.1. Les dispositifs médicaux à base textile.....	18
I.1.1. Généralités.....	18
I.1.2. Matériaux utilisés	22
I.1.3. Risques encourus.....	25
I.2. Innovations récentes	26
I.2.1. Fibres échangeuses d'ions.....	28
I.2.2. Incorporation de molécules actives dans des fibres thermoplastiques	29
I.2.3. Nanoparticules.....	30
I.2.4. Fibres creuses	30
I.2.5. Matrices résorbables.....	31
I.2.6. Molécules cages	31
I.3. Synthèse.....	37
II. Les systèmes multicouches	39
II.1. La formation des films multicouches	39
II.1.1. Principe.....	39
II.1.2. Les procédés.....	41
II.1.3. Les paramètres de construction et leur influence	44
II.1.4. Stabilisation des films	48
II.2. Applications aux biomatériaux	52
II.2.1. Choix des polyélectrolytes	52
II.2.2. Polyélectrolytes « bio-actifs ».....	56
II.2.3. Assemblages multicouches comme réservoirs de principes actifs.....	58
II.3. Conclusion.....	60

PARTIE II : Produits, Matériels & Méthodes	62
I. Polyélectrolytes utilisés	64
I.1. Le polyélectrolyte positif : le Chitosan.....	64
I.2. Le polyélectrolyte négatif : le PolyCTR- β CD.....	66
I.2.1. Synthèse	67
I.2.2. Caractérisation	68
II. Le support textile	69
II.1. Création de groupes carboxylates.....	69
II.1.1. Par hydrolyse.....	70
II.1.2. Par thermofixation.....	70
II.2. Dosage des groupes carboxylates	72
III. Construction des assemblages multicouches	74
III.1. La spectroscopie optique par guide d'onde (OWLS).....	74
III.2. Protocole de construction des multicouches sur textile	76
III.3. Stabilisation des multicouches	78
III.3.1. Réticulation chimique par la génipine	78
III.3.2. Dépôt d'une couche terminale de PLGA.....	79
IV. Caractérisation des assemblages multicouches sur textile.....	80
IV.1. Méthode gravimétrique	80
IV.2. Microscopies	80
IV.3. Analyses ThermoGravimétriques (ATG)	80
IV.4. Spectroscopie Infrarouge	80
IV.5. Zétamétrie	81
IV.6. Dosage des fonctions amines du CHT	82
V. Dégradation des assemblages multicouches	83
V.1. En milieux aqueux	83
V.2. En milieu physiologique	83
VI. Complexation de principes actifs modèles dans les assemblages	85
VI.1. Principes actifs modèles (PAM) étudiés	85
VI.2. Etude de la complexation des PAM avec le polyCTR- β CD.....	86
VI.2.1. RMN	86
VI.2.2. UV-Visible.....	86
VI.3. Différentes méthodes du chargement du système par les PAM	87
VI.3.1. Chargement du PAM par diffusion à travers l'assemblage – Voie B	89
VI.3.2. Complexation du PAM dans le polyélectrolyte anionique – Voie C	89

VI.3.1.	Imprégnation de la 1 ^{ère} couche thermofixée – Voie D	89
VI.4.	Cinétiques de libération	90
VII.	Cytocompatibilité.....	91
VII.1.	Vitalité cellulaire.....	91
VII.2.	Prolifération cellulaire	91
VIII.	Etude microbiologique (avec le BM).....	93
VIII.1.	Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	93
VIII.2.	Test de Kirby-Bauer	93
PARTIE III :	Résultats & Discussion.....	96
I.	Pré-traitement du support.....	98
I.1.	Hydrolyse partielle du PET	98
I.2.	Fonctionnalisation par thermofixation du PET	99
II.	Construction des films multicouches de CHT et de polyCD	101
II.1.	Suivi de l'assemblage par OWLS.....	101
II.1.1.	Suivi de l'auto-assemblage.....	101
II.1.2.	Influence de la force ionique	103
II.1.3.	Influence du pH.....	104
II.2.	Construction LbL sur textile.....	104
II.2.1.	Dépôt de la première couche auto-assemblée (CHT, n=2)	105
II.2.2.	Dépôt de la seconde couche auto-assemblée (polyCD, n=3)	106
II.2.3.	Assemblages LbL sur textile (n > 3)	107
II.2.4.	Caractérisation des assemblages LbL sur textile.....	110
II.3.	Stabilité des assemblages en systèmes batch.....	114
II.3.1.	Influence du milieu.....	115
II.3.2.	Influence de la réticulation	116
II.3.3.	Influence de la masse molaire du CHT	121
II.3.4.	Discussion à propos du profil de dégradation	123
II.3.5.	Conclusion.....	123
III.	Assemblages LbL incluant des principes actifs modèles (PAM).....	125
III.1.	Etude des complexes PAM / polyCD	125
III.1.1.	RMN du proton 1D et 2D	125
III.1.2.	UV-visible	127
III.2.	Construction des assemblages avec les complexes PAM / polyCD	129
III.2.1.	Etude par OWLS	129

III.2.2.	Elaboration de film LbL chargés de PAM sur textile.....	133
III.2.3.	Synthèse et discussion	135
III.2.4.	Influence de la masse molaire du CHT	137
III.2.5.	Implication de la couche thermofixée dans le système réservoir	139
III.3.	Conclusion	141
IV.	Etude de libération des PAM en batch	142
IV.1.	Influence du nombre de couches.....	142
IV.2.	Influence des ratios molaires dans les complexes PAM/polyCD	144
IV.3.	Influence des couches supérieures sur la libération du PAM	147
IV.4.	Influence de la masse molaire du CHT et de la réticulation par la génipine	149
IV.4.1.	Influence de la masse molaire du CHT	149
IV.4.2.	Influence de la réticulation par la génipine	151
IV.4.3.	Conclusion	152
IV.5.	Implication de la couche thermofixée dans le système réservoir	152
IV.6.	Post-imprégnation du système LbL par BM.....	154
IV.6.1.	Comparaison des Voies B, C et D	154
IV.6.2.	Etudes de libération	156
IV.7.	Application à la libération de 2 PAM dans un même assemblage.....	158
IV.7.1.	Etude préliminaire	158
IV.7.2.	Construction des assemblages	159
IV.7.3.	Etudes de libération	162
IV.8.	Conclusion	163
V.	Cytocompatibilité et activité antibactérienne	164
V.1.	Cytocompatibilité	164
V.2.	Activité antibactérienne du système chargé de BM	166
	Perspectives.....	170
	Conclusion générale	176
	Références	180
	Articles.....	202
	Annexes.....	218

Principales abréviations utilisées

Produits, réactifs & polymères

CD / β CD	:	Cyclodextrine – β -cyclodextrine
polyCTR- β CD / polyCD	:	Polymère d'acide citrique et de β -cyclodextrine
CTR	:	Acide citrique
CHT-B	:	Chitosan Bas poids moléculaire
CHT-M	:	Chitosan Moyen poids moléculaire
PLGA	:	Poly(acide lactique co-glycolic)
PBS	:	Tampon phosphate (pH = 7,4 à 25 °C)
PET	:	Polyéthylène téréphtalate
L132	:	Cellule épithéliale de poumon L132
AcOH	:	Acide acétique
TBBA	:	4-tert-butyl acide benzoïque
VM	:	Vert de Malachite
BM	:	Bleu de méthylène
P	:	Paracétamol
Gpn	:	Génipine
NaCl	:	Chlorure de sodium
NaOH	:	Soude

Appareils & Techniques

LbL	:	Layer-by-Layer
IR	:	Infra-Rouge
UV-vis	:	Spectroscopie Ultra-Violet visible
ATG	:	Analyse ThermoGravimétrique
MEB	:	Microscopie Electronique à Balayage
RMN	:	Résonance Magnétique Nucléaire
OWLS	:	Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy (Spectroscopie optique par guide d'onde)

Abréviations de langages

GRB	:	Groupe de Recherche sur les Biomatériaux
UMET	:	Unité Matériaux Et Transformations
PE + / PE -	:	Polyélectrolyte cationique / anionique
PA	:	Principes Actifs
PAM	:	Principe Actif Modèle
GM	:	Gain de Masse
CMI	:	Concentration Minimale Inhibitrice

Introduction Générale

Les textiles d'origines naturelles ou synthétiques entrent dans la composition de nombreux dispositifs extra et intra corporels à applications médicales. Ils sont utilisés pour renforcer, réparer, voire même remplacer des fonctions ou des organes déficients. Parmi ceux-ci on peut citer, par exemple, les pansements, les fils de sutures, ou encore les implants.

Malgré la biocompatibilité des matériaux utilisés, des effets secondaires tels que des allergies, inflammations ou infections impliquent encore des complications post-opératoires à plus ou moins long terme, pouvant aller de la prolongation des périodes de convalescence, jusqu'au décès du patient dans les cas les plus extrêmes. En effet, quelque soit le dispositif, les interactions entre le biomatériau et l'organisme provoquent systématiquement une réponse immunitaire.

Face à ces situations, plusieurs stratégies sont développées afin de permettre une meilleure intégration des textiles dans le corps notamment. Parmi les solutions les plus efficaces, les traitements de surface de ces biomatériaux ont été sélectionnés afin d'améliorer les propriétés des supports textiles. Une voie attrayante consiste à transformer directement le dispositif en un réservoir de molécules actives, capable de libérer celles-ci au niveau des zones ciblées. Sa fonction est alors double, puisqu'il permet d'assurer la fonction première d'implant (fonction mécanique), et aussi une fonction thérapeutique. Dans ce cas, le principal challenge est de modifier chimiquement des supports généralement inertes avec des procédés doux, permettant de conserver leurs propriétés mécaniques originelles sans apporter de nouvelle toxicité, et de piéger suffisamment de molécules actives pour constituer une dose thérapeutique, qui sera ensuite libérée directement dans l'organisme de manière ciblée durant tout le processus de rétablissement.

Les polymères de cyclodextrines largement étudiés par le groupe du Pr. Bernard Martel au laboratoire *Unité Matériaux Et Transformations* (UMET) de l'Université de Lille 1, ont déjà prouvé qu'ils étaient des candidats idéaux pour réaliser de tels systèmes. Grâce à leurs cavités hydrophobes, ils sont bien connus pour former des complexes d'inclusion stables avec de nombreuses molécules et principes actifs plus particulièrement. Déposés en monocouche sur textile par différentes techniques (greffage, plasma), ils confèrent au support des propriétés d'inclusion de principes actifs, qui sont ensuite libérés lorsque l'implant est introduit dans le corps. Cette technique très prometteuse a déjà montré de nombreuses réussites, en particulier au niveau des implants viscéraux et vasculaires, et a fait l'objet de nombreuses publications et de plusieurs thèses au sein de l'équipe.

Le travail présenté ici tente de répondre à la même problématique en décrivant une évolution du concept développé au laboratoire, à l'aide de la technique Layer-by-Layer (LbL). Les films multicouches à base de polyélectrolyte ont beaucoup été étudiés ces dernières décennies, et ils sont régulièrement utilisés pour des applications médicales telles que l'ingénierie tissulaire ou l'adhésion cellulaire. Il s'agit d'élaborer un assemblage multicouche par superposition alternée de polyélectrolytes anioniques et cationiques, qui va permettre la complexation, puis la libération prolongée de médicaments, ou de toutes autres molécules actives, par dégradation successive de ces couches de polymères. Le chitosan et un polymère de β -cyclodextrine sont choisis comme polyélectrolytes. En effet, le premier est un polysaccharide à caractère cationique couramment utilisé dans le domaine biomédical grâce à ses différentes propriétés (bio-résorbable, biocompatible, antibactérien) tandis que l'utilisation du second - qui est issu d'une réaction de réticulation avec l'acide citrique - permet d'utiliser les propriétés de complexation des cyclodextrines pour la vectorisation de principes actifs, mais aussi de valoriser un brevet du laboratoire portant sur la polymérisation de ces molécules cages.

Entre autre, grâce à cette technique, il serait possible de contrôler les taux de molécules piégées au sein du textile, ainsi que leurs cinétiques de libération dans l'organisme par le nombre de couches déposées à la surface. Mais encore, il deviendrait envisageable d'inclure différentes molécules actives au sein d'un même assemblage, lui conférant des propriétés complémentaires (cicatrisant, hémostatique...).

Cette nouvelle étude représente un travail préliminaire sur les assemblages multicouches, qui vise à montrer la faisabilité de l'immobilisation de tels systèmes sur textile, afin d'améliorer, de diversifier et de mieux contrôler l'utilisation des textiles pour la libération prolongée de principes actifs. S'ils s'avèrent efficaces, de tels systèmes seraient adaptables à l'ensemble des applications des textiles à usage biomédical. Les milieux physiologiques, de par leur force ionique et leur haute teneur en protéines, présentent les conditions les plus extrêmes pour de tels dispositifs. C'est pourquoi, ce travail prend le parti de traiter les systèmes comme de futurs implants, amenés à être intégrés dans le corps où à être déposés sur des plaies desquelles diffusent des exudats.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à l'étude bibliographique permettant de contextualiser le sujet de l'étude. Il s'agit, dans un premier temps, de recenser l'ensemble des utilisations textiles dans le milieu des dispositifs médicaux, les matériaux utilisés et les risques encourus par les patients lors de la mise en contact avec ces dispositifs. Les innovations récentes permettant de palier à ces différents problèmes sont également présentées. La technique Layer-by-Layer, qui est le moteur principal de ce projet, est décrite plus longuement. Il s'agit de définir les

modes de construction et de stabilisation des assemblages, ainsi que de démontrer son application au domaine des biomatériaux. Cette étude permettra de prioriser, en particulier, les traitements de surface à base de cyclodextrines et de chitosan, ainsi que l'utilisation des molécules cages dans la construction de systèmes multicouches à propriétés de libération de principes actifs.

La seconde partie de ce manuscrit listera les réactifs et produits ainsi que le matériel, les techniques et les méthodes qui ont été utilisés au cours de la thèse. En particulier, les méthodes de caractérisation des assemblages multicouches seront présentées. La spectroscopie par guide d'onde (OWLS) notamment, suit en direct la construction de ces assemblages et a servi à étudier certains paramètres de construction. La zétamétrie, permet de visualiser les charges à la surface d'un textile et donc de visualiser l'alternance des couches déposées en fonction des groupements ioniques de celles-ci. Les dosages par UV-visible, ou encore la gravimétrie ont aussi été utilisés pour caractériser les assemblages. De même, les différents essais pour tester la cytocompatibilité des constructions ainsi que leur activité antimicrobienne seront décrits.

La troisième partie de ce document présentera les différents résultats obtenus lors de la construction et la caractérisation de tels assemblages. Premièrement, l'optimisation de la construction des assemblages ainsi que leurs caractérisations seront détaillées. Puis, l'inclusion de principes actifs modèles au sein des assemblages, suivis des études de libérations dans différents milieux de ces derniers seront présentées, afin de discuter de la capacité de ces systèmes à être utilisés comme réservoirs de principes actifs. Finalement, les propriétés biologiques et bactériologiques seront étudiées afin de justifier de la possible utilisation de tels systèmes pour des applications médicales.

Pour clore l'étude, les perspectives qui en découlent seront développées et les principales conclusions des différentes études seront finalement résumées.

PARTIE I :

Étude Bibliographique

I. Dispositifs médicaux textiles et traitement de surface

I.1. Les dispositifs médicaux à base textile

I.1.1. Généralités

Les textiles techniques représentent une part importante sur le marché mondial du textile. En effet, la valeur de ce marché est passée de 65 à 85 milliards d'euros entre 1995 et 2005¹. L'Asie en consomme environ la moitié, suivie de l'Amérique et de l'Europe.

Le terme de textile technique englobe de nombreux secteurs d'applications tels que les sports et loisirs, l'emballage ou encore l'aménagement de la maison. Le secteur du médical et de la santé, qui représente 10 % de la consommation mondiale en textile technique et 20 % de la production française², est celui qui offre actuellement les meilleures perspectives de croissance puisqu'il permet le développement de textiles à très haute valeur ajoutée, destinés à des applications pointues.

En effet, leurs propriétés multiples ont fait des matériaux textiles des candidats de choix pour répondre aux attentes des cliniciens et des patients, aussi bien au niveau de dispositifs externes (linges) que de dispositifs implantables (prothèses).

Dans cette partie, nous dresserons un panorama de toutes les possibilités qu'offrent les matériaux textiles pour les technologies de la santé. Ce secteur peut se diviser en trois sous-sections, chacune correspondante à une application différente des dispositifs textiles³.

1.1.1.a) Dispositifs de diagnostic et de surveillance

Premièrement, on retrouve les textiles au niveau des dispositifs de diagnostic et de surveillance. Un tel dispositif a pour but de suivre l'évolution d'un état de manière non-invasive et peut être implantable dans certains cas (pacemakers par exemple). Les solutions ambulatoires sont désormais privilégiées afin de permettre la convalescence du patient à domicile plutôt qu'à l'hôpital. Dans ces dispositifs, le textile n'est généralement pas utilisé pour le fonctionnement propre de l'appareillage, mais sert de support aux capteurs, ce qui permet de les laver en retirant préalablement l'électronique (cf. Figure 1).



Electrode et brassard
pour tensiomètre,
GIRO MEDICAL

Figure 1: Exemple de dispositifs textiles de diagnostic⁴

Pendant, les perspectives pour le textile sont nombreuses. En effet, des études visent à obtenir des capteurs 100% textiles par intégration de nanotubes de carbone par exemple dans le filage, permettant une conduction électrique⁵, ou encore de réaliser directement des vêtements capables de suivre les activités vitales de son porteur^{6,7}.

1.1.1.b) Dispositifs de protection et d'hygiène

La catégorie des dispositifs de protection et d'hygiène présentée dans ce paragraphe, est la plus importante en termes de volume de textile utilisé. Elle peut d'ailleurs se scinder elle-même en plusieurs thématiques. En effet, on peut séparer le linge hospitalier (jetable ou réutilisable) des produits d'hygiène et des systèmes de filtration.

Le linge réutilisable se situe en général au niveau de la chambre du patient (litterie) mais également au niveau des vêtements du personnel soignant. Pour le CHRU de Lille par exemple, on considère que cette catégorie représente 1 M€ par an⁸ avec 30 000 vêtements professionnels et 4000 tonnes de textile lavées. Le linge jetable se retrouve quant à lui surtout au niveau des blocs opératoires (champs opératoires), qui nécessitent des produits stériles difficilement lavables une fois contaminés par du sang humain.

On appelle produits d'hygiène les textiles absorbants et les lingettes, qui sont majoritairement des produits jetables. Cette famille regroupe les produits contre l'incontinence, c'est-à-dire les changes pour bébés, les produits relatifs à l'hygiène féminine et à l'incontinence adulte et les produits relatifs à l'hygiène du patient en hôpital (cf. Figure 2).



Figure 2: Exemples de textiles utilisés pour les produits d'hygiène et de filtration^{9,10}

En ce qui concerne les systèmes de filtration, les exigences sanitaires strictes requièrent une qualité de l'air supérieure à la moyenne dans les bâtiments de santé. On trouve donc les dispositifs textiles au niveau des filtres à air des bâtiments, mais ils sont également majoritaires dans la composition des masques médicaux et respiratoires (cf. Figure 2). Pour les liquides, le principal marché d'application se trouve au niveau de la filtration du sang, par exemple pour les dialyses ou les perfusions.

1.1.1.c) Les dispositifs de soin et de thérapie

De nos jours, rares sont les dispositifs de soin et de thérapie qui n'utilisent pas de textiles dans leur composition. On en retrouve par exemple dans tous les types de chirurgie, de la chirurgie neurologique à orthopédique en passant par la chirurgie vasculaire ou viscérale. Ils sont utilisés pour remplacer, renforcer, réparer des plaies et des organes déficients. Il n'existe pas de dispositif universel car ceux-ci sont tous adaptés à un type de fonction en particulier, qui répond également aux exigences de confort du patient. La Figure 3 suivante donne quelques exemples de dispositifs issus des chirurgies vasculaire et viscérale ainsi que des dispositifs textiles à usage externe.

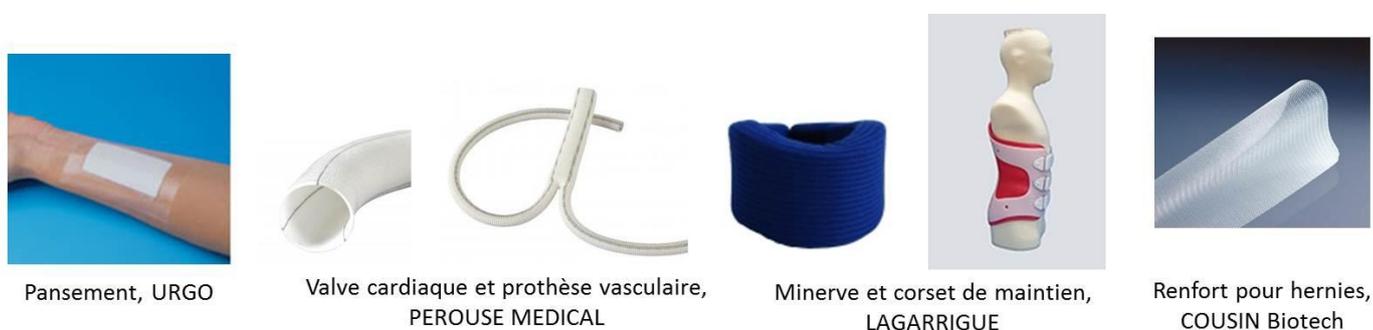


Figure 3: Quelques exemples de dispositifs de soin et de thérapie^{11,12,13,14}

Généralement, cette famille de dispositifs est scindée en plusieurs sous-parties en fonction des applications, mais parfois aussi en fonction des matériaux utilisés ou de leurs techniques de fabrication. Le Tableau 1 suivant liste les principales catégories de dispositifs de soin et de thérapie ainsi que leurs caractéristiques en fonction des applications visées.

Tableau 1: Principales catégories et caractéristiques des dispositifs de soin et de thérapie

Catégories		Propriétés	Emplois	Exemples
Traitement des plaies	Matériels de sutures	Faciliter la manipulation Résistance mécanique Eviter les réactions inflammatoires et infectieuses	Interne à Externe	Fil résorbable ou non
	Pansements	Couvrir et protéger la plaie Maintenir la plaie dans un environnement contrôlé Favoriser la cicatrisation	Externe – en contact direct avec les plaies	Pansement à escarres ou brûlures ¹¹ Compresse non adhésive...
Patches Systèmes transdermiques		Administer des substances médicamenteuses à travers la peau	Externe	Patch contraceptif Patch anti-tabac
Prothèses & Implants	Prothèses	Pallier une fonction déficiente	Externe ou Interne	Prothèse de jambe Implant ligamentaire Endoprothèse vasculaire ¹² Anneau gastrique Valve cardiaque Renfort pariétal ¹⁴ ...
	Implants	Traiter ou remplacer un organe - provisoire ou permanent	Interne	
Orthèses et textiles compressifs		Compenser une fonction Immobiliser Assister une partie du corps articulaire ou musculaire Compression médicale	Externe	Bas de contention Attelle Corset ¹³ Minerve Collier cervical Ceinture lombaire Bandage...

Ainsi, les textiles techniques sont utilisés dans toutes sortes de dispositifs médicaux, aussi bien pour la literie que pour les dispositifs implantables. Selon l'utilisation, la valeur ajoutée ne sera

donc pas la même et l'on s'attend à des prix variés. En effet, un drap de lit ne nécessite pas les mêmes précautions ni le même coût de fabrication qu'un champ opératoire ou qu'un implant vasculaire. C'est pourquoi, le choix du matériau de base dans la conception de tels dispositifs est à prendre en compte.

Dans cette étude, l'attention sera focalisée plus particulièrement sur la dernière catégorie de dispositifs présentée, c'est-à-dire les dispositifs de soin et de thérapie.

1.1.2. Matériaux utilisés

1.1.2.a) Généralités

Selon les propriétés désirées (souplesse, porosité, résistance mécanique...) il est possible d'utiliser de nombreuses techniques de filage textile (fibres et fils tissés, tricotés, tressés, non tissés...) mais également de nombreux matériaux (synthétiques, naturels...)^{15,16}.

Pour les applications dispositifs médicaux et biomatériaux, le choix des matériaux est plus restreint puisque le cahier des charges pour ces textiles est relativement ciblé. En effet, les matériaux doivent, en plus de leurs propriétés mécaniques, être biocompatibles, qu'ils soient implantables (limiter les risques de rejet) ou non (limiter les risques d'allergie).

Si les premières fibres utilisées étaient d'origine naturelle (coton, lin, chanvre...), l'essor des fibres textiles synthétiques à partir des années 1930 grâce à la découverte du nylon par la société américaine Du Pont¹⁷ a nettement modifié le marché.

L'utilisation de fibres naturelles répond aux enjeux de développement durable et de recyclage actuel, mais elles ne sont pas forcément synonymes d'écologie, comme le prouvent par exemple les fibres de bambou qui nécessitent de nombreux solvants chimiques avant la formation d'une viscose. A contrario, les fibres synthétiques sont souvent synonymes de pollution puisqu'issues des ressources non renouvelables et présentant une faible biodégradabilité. Cependant, ces dernières ont souvent montré de meilleures propriétés (tenue mécanique, résistance à la chaleur...), elles restent plus facilement modifiables chimiquement (coloration, additifs...) et leur prix est très attractif. A ce jour, les deux types de fibres sont utilisés, avec toutefois une grande prédominance des fibres synthétiques. Le Tableau 2 suivant regroupe les principales matières textiles utilisées dans le domaine de la santé, et plus particulièrement au niveau des dispositifs médicaux¹⁸.

Tableau 2: Liste non exhaustive des principaux matériaux utilisés pour les textiles dans les dispositifs médicaux (N : naturelle, S : synthétique)

	Origine	Avantages	Inconvénients	Exemples
Coton¹⁹ / Cellulose²⁰ / Viscose	N	Peu cher, hypoallergénique, perméabilité à l'air, facile à laver, biocompatibilité	Sensible à l'humidité, facilement déchirable, mauvaise tenue au lavage	Blouse médicale, literie, bandage, matériaux absorbants, doublure/rembourrage, masques chirurgicaux...
Soie^{21,22}	N	Bonnes propriétés mécaniques, biocompatibilité, biodégradabilité	Prix, entretien	Sutures, tendons/ligaments artificiels
Polyester^{23,24}	S	Peu cher, biocompatibilité, stérilisable	Tient très chaud, peu recyclable, impact environnemental pendant la fabrication	Sutures, tendons / ligaments artificiels, prothèses vasculaires, reins artificiels, masques chirurgicaux, champs opératoires, literie, blouses...
Polypropylène^{25,26}	S	Bon marché, biocompatibilité, indéchirable, stérilisable, recyclable	Fragile, sensible aux UV, impact environnemental pendant la fabrication	Sutures, poumon artificiel, blouses, produits pour l'incontinence
Polyamide (nylon)^{27,28}	S	Peu cher, séchage rapide, très bonnes propriétés mécaniques, biocompatibilité	Faible pouvoir absorbant, combustion dangereuse	Sutures, bas de contention

De tous ces matériaux, la famille des polyesters est la plus répandue et représente à elle seule plus de la moitié des fibres textiles produites mondialement²⁹. On retrouve notamment dans cette famille le Polyéthylène téréphtalate (PET), dont la première fibre, le Dacron[®], a été commercialisée en 1953 par la société Du Pont³⁰.

1.1.2.b) Le PET

Le PET (cf. Figure 4) est un polyester très répandu et sa synthèse est bien maîtrisée industriellement, suivant différents procédés³¹ qui ne seront pas détaillés ici.

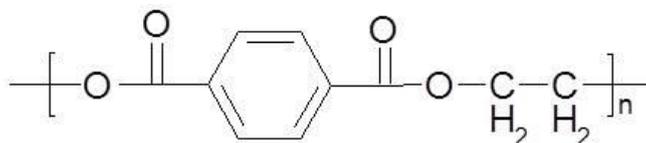


Figure 4: Représentation du PET

Pour ce polymère synthétique, l'application fibres et fils est la plus importante en termes de tonnage produit et cet étirage permet de lui conférer des propriétés intéressantes (cf. Tableau 3), telles qu'une très bonne résistance à la rupture et une haute température de fusion permettant de le travailler à des températures élevées.

Tableau 3 : Quelques propriétés des fibres de PET

Densité	1,38 – 1,39
Température de fusion (°C)	258 – 263
Résistance à la rupture (MPa)	3400 – 11 550 (en fonction de la ténacité)
Elongation à la rupture (%)	10 – 40 (en fonction de la ténacité)
Recouvrement élastique (%) à 5 % d'élongation	88 – 93

Si le PET sous forme de fibres est autant utilisé, c'est également qu'il est possible de le travailler sous différentes formes : tressé, tissé, non-tissé, tricoté, etc...

La forme non tissée (Figure 5) est obtenue par voie fondue et est économiquement la plus intéressante. Le polyester est extrudé à travers une filière et les fibres étirées sont enchevêtrées par action de jet d'air et forment une nappe d'épaisseur régulière sur un tapis qui est calandré à chaud ce qui permet de lier les filaments élémentaires entre eux³². Cette forme est particulièrement appréciée puisque dans ce cas, la résistance des matériaux est très importante et on ne retrouve pas, comme cela peut être le cas pour un matériau tissé ou tricoté, une orientation préférentielle des propriétés.



Figure 5: Photo du PET non-tissé et observation par microscope optique (x5)

De par son faible coût, sa stabilité chimique, ses bonnes propriétés mécaniques ainsi que sa biocompatibilité, le PET est un matériau très répandu dans le domaine du biomédical^{33,34} en particulier pour les sutures ou encore les implants³⁵.

I.1.3. Risques encourus

Précédemment, on a pu constater que les dispositifs médicaux étaient nombreux, avec diverses applications et divers matériaux. Cependant, qui dit dispositif médical dit contact avec le patient et donc réaction induite de son système immunitaire et possibles risques quelque soit le dispositif concerné. Par exemple, même s'il n'est pas l'unique responsable, le linge hospitalier serait à lui seul impliqué dans 17 % des maladies nosocomiales⁸.

Malgré la biocompatibilité des supports textiles utilisés, des effets secondaires impliquent encore des complications post-opératoires qui peuvent allonger les périodes de convalescence voire provoquer le décès du patient dans les cas les plus extrêmes³⁶. En effet, dans le cas d'implants ou de prothèses internes, la colonisation bactérienne du dispositif est suivie de la formation d'un biofilm bactérien à sa surface qui annonce les prémices de plus sérieuses complications³⁷. Les dispositifs peuvent donc causer des réactions d'inflammations ou d'infections³⁸ qui peuvent conduire à leurs rejets. Tous les dispositifs sont susceptibles de causer la formation de ces biofilms et une période décisive critique de 6 h après l'implantation a été établie, pendant laquelle l'implant est particulièrement sensible à la colonisation de surface³⁹. Une nouvelle opération pour retirer le dispositif afin d'éviter les chocs anaphylactiques, combinée à un traitement antibiotique prolongé, conduisant à la fois au stress du patient et à des coûts supplémentaires, sont les seules solutions pour remédier à ces problèmes. En effet, même pour un individu présentant d'excellentes réponses immunitaires, les infections par biofilms sont rarement résolues par les mécanismes de défenses naturelles et se manifestent communément par des infections chroniques⁴⁰.

Les dispositifs médicaux ne sont donc pas sans risque, et plus encore lorsqu'ils sont amenés à être implantés dans le corps. L'intégration d'un implant induit une modification interne ce qui entraîne à son tour un changement d'environnement pour tout le système et qui se traduit par des réponses immunitaires plus ou moins violentes et plus ou moins graves selon les circonstances³⁷.

C'est pourquoi de nombreuses recherches se sont développées au cours du temps, d'une part pour apporter des propriétés complémentaires aux textiles (délivrance directe de médicaments) au cours du temps, et d'autre part pour permettre une meilleure intégration des implants médicaux dans le corps. Car désormais, on ne recherche plus uniquement à ce que les matériaux soient inertes ou biocompatibles, mais au contraire qu'ils assurent la bonne intégration de l'implant.

I.2. Innovations récentes

Il est avéré que certains matériaux sont plus sensibles à la colonisation bactérienne que d'autres comme le silicone par exemple⁴¹. Ainsi, il faut combiner à la fois propriétés mécaniques et sensibilité à la colonisation lors de la réalisation d'un dispositif. Cependant, il n'est pas toujours possible de modifier le matériau de base, pour des raisons techniques et réglementaires, et c'est à ce niveau que le challenge est important.

Depuis quelques années, des solutions sont développées pour permettre une meilleure intégration de l'implant médical dans le corps. Parmi celles-ci, on retrouve l'immersion des dispositifs dans des solutions d'antibiotiques juste avant l'implantation qui n'est efficace qu'à très court terme. Afin de réduire la colonisation bactérienne des dispositifs, d'autres techniques ont été envisagées avec plus ou moins de succès. Les alternatives mécaniques par exemple (modification du design de l'implant, de l'orientation en brosse du polymère, etc...), se sont révélées très décevantes et ne sont applicables que pour les très courtes durées³⁷. On cherche maintenant à réaliser une surface qui, à défaut d'éradiquer la progression des films biocides, permettrait au moins le ralentissement de sa formation. Il s'agit dans cette partie de présenter les traitements de surface qui répondent le mieux à ce défi.

Dans un premier temps, des traitements de surface ont été sélectionnés afin de modifier les propriétés physico-chimiques des supports et de contrôler l'adhésion et la prolifération cellulaire. Ils ont été largement étudiés et sont toujours en plein essor. Il s'agit de modifier la surface du textile en lui conférant des nouvelles propriétés, antibactériennes par exemple, en ajoutant une espèce bioactive à la surface du polymère et le caractère actif devient alors inhérent au textile. De nombreuses espèces présentant une activité contre la prolifération des cellules bactériennes ont déjà été utilisées. Il a notamment été possible d'immobiliser des enzymes⁴², des peptides⁴³, des polysaccharides⁴⁴ et des agents antimicrobiens⁴⁵ à la surface des textiles augmentant ainsi leur activité antimicrobienne.

Pour ce faire, c'est le greffage covalent sur la surface qui est l'une des techniques les plus utilisées comme présentée en Figure 6⁴⁶ :

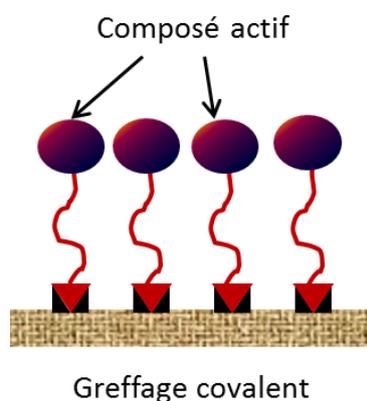


Figure 6 : Greffage covalent d'un composé actif sur une surface textile

En effet, les liaisons covalentes apparaissent comme la méthode permettant les liens les plus stables entre l'actif et le support textile. De nombreuses techniques chimiques existent pour réaliser ces greffages mais elles nécessitent souvent de casser ou construire des liaisons et donc l'utilisation de solvants souvent incompatibles avec des applications médicales⁴⁶. Cependant, certaines, comme le greffage par plasma ou par faisceau d'électron (Electron Beam, EB), permettent d'éviter l'usage de solvant en préservant au mieux l'intégrité du support⁴⁷.

Dans cette catégorie des traitements de surface, on peut citer par exemple les textiles recouverts d'héparine. L'héparine est une molécule qui a fait ses preuves en tant qu'agent anticoagulant et est souvent inoculée par voie intraveineuse aux patients à risque vis-à-vis de la thrombose⁴⁸. Les surfaces recouvertes d'héparine (aussi bien métalliques que textiles d'ailleurs) ont été largement développées et présentent un succès grandissant^{49,50} au niveau des dispositifs vasculaires.

Par modification de surface du support, il est donc possible de lui conférer de nouvelles propriétés. La surface nouvellement activée permet ainsi de défavoriser l'interaction bactérie/support et donc de ralentir voire d'éradiquer la colonisation bactérienne. Cependant, ces traitements de surface ne connaissent que de modestes succès cliniques, principalement à cause de la diversité des environnements dans lesquels les dispositifs sont implantés et les multiples mécanismes d'adhésion qu'ont les bactéries à leur disposition pour coloniser les surfaces⁵¹. Par ailleurs, ils sont souvent à combiner avec des traitements antibiotiques. Cependant, lorsqu'elles sont ingérées, les molécules actives ont tendance à être métabolisées dans les organes digestifs, ce qui diminue leur efficacité, nécessitant des doses plus importantes. C'est pourquoi, les études se tournent également vers la création de dispositifs « actifs » qui, en plus de diminuer la colonisation

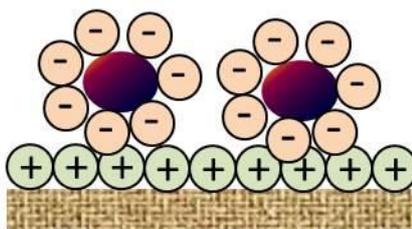
bactérienne, servent également de vecteurs de principes actifs. Il s'agit de transformer directement le dispositif en un réservoir de molécules actives capable de libérer les médicaments ou autres substances actives au cours du temps. Ces dispositifs sont créés pour libérer l'agent médicamenteux durant la période critique d'après implantation (quelques heures) afin d'inhiber le développement bactérien. Cependant, une libération continue sur une période plus longue (semaine à mois) est très désirable puisque l'intégration définitive de l'implant dans les tissus nécessite des temps plus longs.

Pour cette stratégie, le principal challenge est de modifier chimiquement les supports généralement inertes avec des procédés doux afin qu'ils conservent leurs propriétés, tout en adsorbant suffisamment de molécules actives pour constituer une dose thérapeutique qui sera libérée durant tout le processus de rétablissement⁵². Ces dispositifs possèdent alors une double fonction : ils servent à renforcer ou réparer des organes déficients, mais aussi à libérer une dose de molécules actives (antibiotiques par exemple) permettant de faciliter l'intégration de l'implant dans le corps mais également de délivrer un traitement ciblé directement dans la zone concernée. Il s'agit, pour ces dispositifs, de piéger suffisamment de principe actif pour permettre une libération prolongée dans le temps, tout en respectant les doses thérapeutiques sans excéder les seuils de toxicité, sans oublier qu'une dose délivrée en deçà du seuil pourrait aussi générer des résistances au traitement non-désirables. De tels dispositifs sont envisageables pour toutes sortes d'applications, des dispositifs orthopédiques aux dispositifs vasculaires⁵³.

Une liste non exhaustive des différentes techniques récentes utilisées pour parvenir à de tels systèmes textiles et piéger les substances actives, ou autres antibiotiques au niveau d'un support textile pour applications médicales, est donnée ci-après.

1.2.1. Fibres échangeuses d'ions

Comme leur nom le suggère, ces fibres portent des groupes ionisés (+ ou -) dont le contre-ion est mobile et substituable. Dans le cas d'interactions électrostatiques, la surface du textile doit être chargée, de même que la molécule ou le polymère actif qui va y être déposé (cf. Figure 7). Ici, les médicaments agissent comme les contre-ions mobiles qui viennent se déposer à la surface du support⁵⁴. Un changement de pH ou de force ionique dans l'environnement par exemple, provoquera la libération des molécules adsorbées à la surface.



Fibres échangeuse d'ions

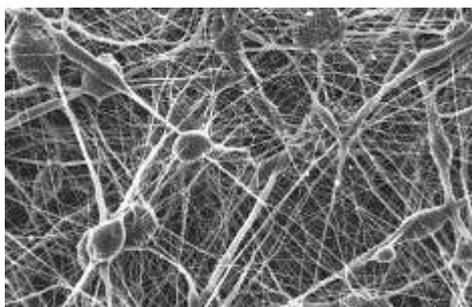
Figure 7: Principe des fibres échangeuses d'ions

Les fibres échangeuses d'ions existent déjà commercialement (Smopex®), mais il est possible d'apporter des charges en surface des nombreux matériaux synthétiques ou naturels utilisés dans les dispositifs médicaux (cellulose, PET, polyamide...). Cependant, de manière générale, le taux de molécules actives piégées de cette façon n'est pas très élevé et l'on est rarement certain d'atteindre un taux nécessaire pour observer une efficacité. De plus, ces interactions sont faibles, et très dépendantes du milieu environnant (pH, force ionique...), ce qui ne permet pas aux textiles une activité très longue.

C'est pourquoi, des greffages covalents mais destructibles sont également à l'étude. On peut citer l'équipe de Suzuki *et al.* qui présente un nouveau concept très ingénieux de dispositif libérant de la gentamicine uniquement lorsqu'il est mis dans un environnement infecté par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*^{55,56}. Dans ce cas, la gentamicine est piégée par des liaisons covalentes spécifiquement créées pour ne se casser qu'en présence de protéinase, ce qui permet la libération spécifique de la molécule dans un environnement précis.

1.2.2. Incorporation de molécules actives dans des fibres thermoplastiques

Dans ce cas, les molécules actives sont introduites directement à l'étape de fabrication du textile au niveau du liage des fibres (Figure 8). La suspension médicamenteuse est directement mélangée avec la matrice polymère utilisée pour la production des fibres⁵⁷.

*Figure 8: Exemple du resveratrol (4%) incorporé dans des fibres de polycaprolactone⁵⁷*

Cette technique présente malgré tout quelques désavantages. En effet, les molécules actives doivent être miscibles avec la matrice polymère, ce qui est rarement le cas, et par ailleurs, les traitements à haute température nécessaires à la formation de la plupart des fibres synthétiques peuvent conduire à une dégradation et/ou perte de l'activité de ces molécules.

1.2.3. Nanoparticules

Il est envisageable de réaliser des systèmes équivalents avec de nombreuses nanoparticules à propriétés d'encapsulation de principes actifs⁵⁸. Les pansements traités à partir de nanoparticules d'argent en sont un bon exemple. Les nanoparticules d'argent ont récemment prouvé leur effet antibactérien⁵⁹ et, déposées sur des fibres textiles, se libèrent au fur et à mesure permettant d'empêcher la colonisation bactérienne⁶⁰ à la surface du pansement et donc protègent la plaie des éventuelles complications⁶¹. Un exemple sur fibre de cellulose est donné en Figure 9.

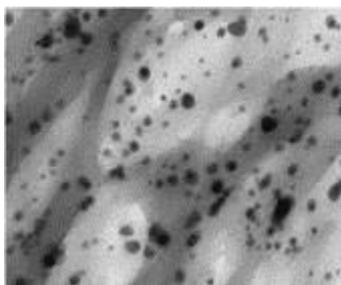


Figure 9: Image par microscope électronique en transmission de cellulose imprégnée de particules d'argent (ratio 10:1)⁶⁰

Ce système fait l'objet d'une commercialisation par les laboratoires URGO, par exemple sous l'appellation Urgocell[®] Silver / Cellosorb[®] Ag, ou encore par la société Mölnlycke Healthcare dans la gamme Mepilex Ag[®].

1.2.4. Fibres creuses

Une autre technique consiste à utiliser des fibres creuses dans lesquelles le principe actif est incorporé. Les tubes ainsi formés peuvent être remplis par une solution médicamenteuse ou par un médicament liquide, mais un cœur cristallin peut aussi être introduit⁶² de même que des nanoparticules⁶³. La libération prolongée dépend alors de l'épaisseur et de la perméabilité du support utilisé. Un exemple de fibre creuse synthétisée par Polacco *et al.* est donné en Figure 10.

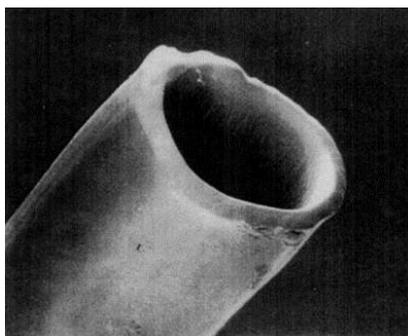


Figure 10: Fibres creuses à base d'un copolymère de poly(acide lactique) et d' ϵ -caprolactone pour l'inclusion de nanoparticules⁶³

Cependant, la conception de tels dispositifs est encore relativement compliquée et onéreuse et donc plus difficile à mettre en pratique d'un point de vue dispositifs médicaux.

1.2.5. Matrices résorbables

Pour réaliser un tel cahier des charges, les dispositifs résorbables sont particulièrement appréciés⁶⁴. Les molécules piégées sont alors libérées au fur et à mesure de la dégradation de celui-ci⁶⁵. Cette technique est très utile au niveau des dispositifs dentaires ou de reconstruction osseuse ou cutanée, quand les dispositifs ne sont pas amenés à rester de manière prolongée dans l'organisme. Cependant, la dégradation complète au cours du temps de la plupart des dispositifs n'est pas souhaitable quand ils viennent renforcer ou remplacer une fonction.

Il a donc été envisagé de déposer une matrice polymère chargée en principes actifs et biorésorbable sur le textile, permettant de libérer les molécules par dégradation de cette matrice⁶⁶. Il s'agit toutefois de ne pas modifier les propriétés mécaniques du support ainsi modifié.

La société BIOMET commercialise déjà des dispositifs présentant sur le support textile des matrices résorbables à base de caprolactones⁶⁷. Le principal challenge réside désormais dans la possibilité de combiner cette matrice à un traitement spécifique par piégeage d'antibiotiques et libération prolongée de ceux-ci.

1.2.6. Molécules cages

Une dernière technique pour rendre les textiles médicaux vecteurs de médicament et donc former des dispositifs « actifs », est très prometteuse et extrêmement étudiée en particulier au laboratoire UMET de l'Université de Lille 1. Il s'agit de systèmes à libération de médicaments à partir de molécules cages, permettant la complexation des principes actifs. Cette technique permet en

effet d'apporter des propriétés de vecteurs de médicaments à la plupart des matériaux textiles de base utilisés dans la formation des dispositifs médicaux. Plusieurs molécules présentant ces propriétés peuvent être utilisées et ont été étudiées, telles que les aza-ethers couronnes, les fullerènes ou encore les cyclodextrines⁶⁸ (cf. Figure 11).

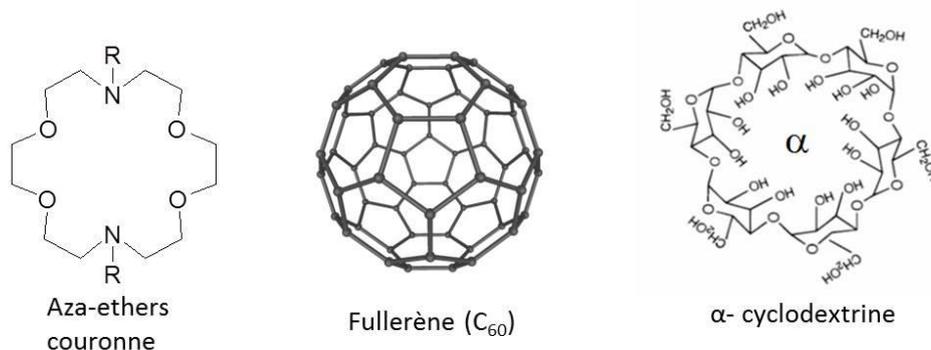


Figure 11 : Exemples de molécules cages utilisées dans le traitement de surface textile

Ces molécules sont introduites au niveau de la surface du textile, par greffage covalent par exemple, permettant le piégeage des molécules actives, en utilisant le support directement comme un réservoir de molécules actives.

Cependant, le critère économique est également à prendre en compte lors de la réalisation de tels systèmes. Les aza-ethers couronnes et les fullerènes présentent des prix considérablement plus élevés que les cyclodextrines natives pour des propriétés équivalentes (à partir de 50€ pour un gramme contre 90€ pour 25 g pour la βCD, données Sigma-Aldrich). C'est pourquoi, ce sont ces dernières qui ont particulièrement retenu notre attention et dont l'utilisation est développée ici plus en détails.

1.2.6.a) Cyclodextrines et dérivés

Les molécules de cyclodextrines (CD) ont été découvertes en 1891 par Villiers, et n'ont cessé dès lors, d'intéresser la communauté scientifique. En effet, ce sont des molécules cages capables de former des complexes d'inclusion avec de nombreuses molécules hydrophobes et d'augmenter leurs solubilités dans l'eau^{69,70}.

Les cyclodextrines sont des oligomères cycliques du glucose issus de la dégradation de l'amidon par l'enzyme CGTase. Elles sont composées de 6 à 12 unités glucopyranoses reliées par des liaisons α-1,4 mais dont les plus communes sont celles à 6, 7 et 8 unités qui sont respectivement nommées α, β et γ cyclodextrines (cf. Figure 12.a)). Ainsi, elles possèdent toutes une cavité disponible plus ou moins grande en fonction du nombre d'unités formant le cycle.

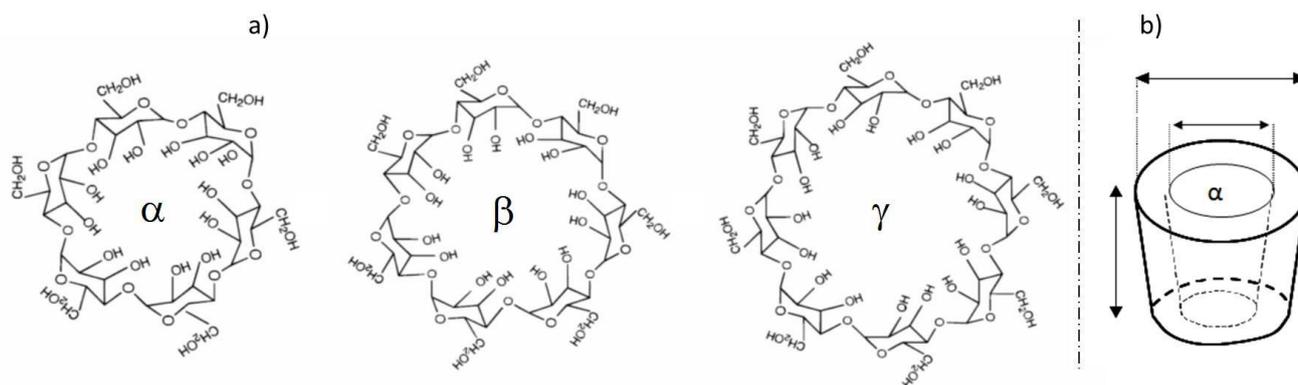


Figure 12: Formules chimiques des cyclodextrines natives les plus courantes

Les CD ont une structure de cône tronqué, imposée par le manque de libre rotation des différents motifs glucose, comme présentée en Figure 12.b). De plus, la distribution spécifique des groupements hydroxyle à l'extérieur de la cavité (3 par unité glucose) leur confère un caractère hydrophile, tandis que la cavité, riche en électrons grâce à la présence des liaisons éther-oxydes, est hydrophobe. Ce sont ces propriétés qui leur donnent une capacité d'inclusion réversible avec des molécules invitées.

Les principales propriétés des CD les plus communes sont regroupées dans le Tableau 4 suivant.

Tableau 4: Principales caractéristiques des trois principales CD

	α	β	γ
Formule brute	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{70}O_{35}$
Nombre d'unités glucose	6	7	8
Masse molaire (g/mol)	972	1135	1297
Solubilité – H₂O, 25°C (g/L)	145	18,5	232
Diamètre interne de la cavité (Å)	5,0	6,3	7,9
Volume de la cavité (Å³)	174	262	427

Il est possible de modifier ces CD natives par estérification des groupements hydroxyle par exemple, mais de nombreux autres moyens existent. Plus de 1500 dérivés sont décrits dans la littérature, dont une centaine disponible commercialement^{71,72}. Si ces dérivés sont aussi présents,

c'est qu'ils présentent tous les propriétés d'inclusion décrites précédemment. De fait, des molécules apolaires dans un environnement défavorable peuvent s'inclure préférentiellement dans les cavités des CD pour former un complexe réversible comme représenté en Figure 13. Cette inclusion peut être totale ou partielle.

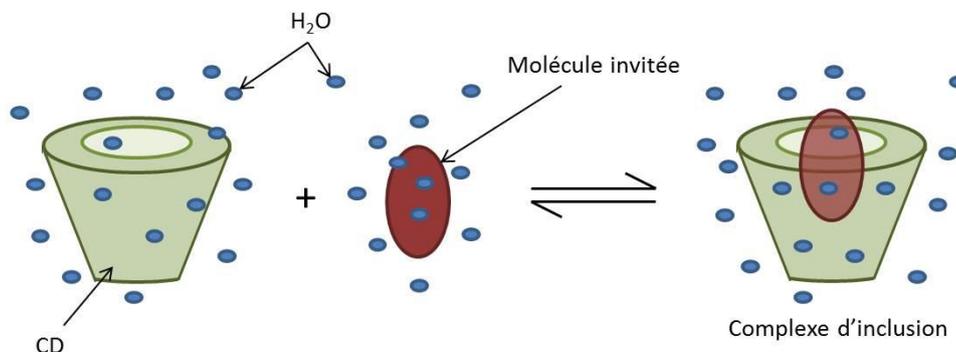


Figure 13: Inclusion d'une molécule invitée dans une cavité de cyclodextrine

Le facteur stérique est à prendre en considération pour la formation de tels complexes, il nécessite une concordance entre le volume de la cavité et la taille de la molécule invitée. En effet, une trop grosse molécule ne pourra pas être incluse dans la cavité, tandis qu'une trop petite molécule ne permettra pas d'interactions avec l'intérieur de la cavité, empêchant son immobilisation réversible. La constante d'association K_a , reflète la force d'interaction entre les deux espèces mises en jeu.

$$K_a = \frac{[CDS]}{[CD] \cdot [S]}$$

*Détermination de la constante de complexation
entre la molécule de CD et la molécule invitée S*

Cette propriété de complexation qui permet de stabiliser, d'augmenter la solubilité et la biodisponibilité des principes actifs, a fait des cyclodextrines et de ses dérivées des molécules très largement étudiées et utilisées comme vecteur de molécules actives⁷³⁻⁷⁶. C'est pourquoi, de nombreux tests ont donc été réalisés sur animaux avec différents modes d'administration, et seulement une toxicité à très hautes concentrations a été révélée, ce qui autorise les applications dans le domaine médical^{77,78}. On peut citer par exemple l'utilisation des CD par les laboratoires Pierre Fabre⁷⁹ pour solubiliser le Piroxicam, qui est utilisé comme anti-inflammatoire sous forme de comprimés effervescents ou sécables pour lutter contre l'arthrose (BREXIN®).

Les propriétés des CD sont également utilisées dans l'industrie textile pour stabiliser des colorants par exemple ou pour piéger des odeurs⁸⁰. Il existe donc plusieurs techniques permettant d'immobiliser ces molécules sur les textiles.

1.2.6.b) Traitements de surface textile par les cyclodextrines et applications

Puisque les CD sont largement utilisées dans l'industrie textile, de nombreuses techniques pour les incorporer à tout type de supports textiles (coton, laine, polyester, polyamide, polypropylène...) ont été développées au cours du temps⁸¹. Ils mettent en jeu aussi bien des interactions faibles (ioniques, Van der Waals) que des liens covalents ou encore des agents de réticulation. Le greffage covalent nécessite toutefois un groupement de fixation à la surface du textile et est donc plus approprié pour les fibres naturelles, naturellement riches en fonctions de surface.

En 1982, un premier brevet décrivait une méthode de fixation de CD en utilisant l'épichlorhydrine comme agent de greffage sur un support cellulosique⁸². Puis, de nouvelles techniques sont apparues comme l'incorporation de CD directement dans le polymère constituant les fibres textiles développée par Uyar *et al.* Le support ainsi formé présente de bonnes propriétés de piégeage des molécules, idéales pour la filtration^{83,84}. Le greffage de CD est également permis par activation de la surface par plasma⁸⁵. En vue de futures industrialisations pour l'industrie médicale, de tels procédés de fixation se doivent d'être économiquement viables, de ne pas utiliser de technologies trop sophistiquées et surtout d'éviter au maximum l'usage de réactifs toxiques.

Durant la dernière décennie, le groupe de recherche de l'UMET de l'Université de Lille 1 a développé une voie originale pour fixer des CD sur différentes surfaces fibreuses ou poreuses. Cette technique est basée sur l'enrobage des fibres textiles par un polymère de CD (poly- β CD) obtenu par réticulation des CD en présence d'un agent réticulant⁸⁶. Ce dernier est un acide polycarboxylique (l'acide citrique par exemple) présentant au minimum trois groupements carboxyliques afin d'obtenir un réseau polymère⁸⁷. Le mécanisme réactionnel de la formation de ce polyCTR-CD est présenté en Figure 14.

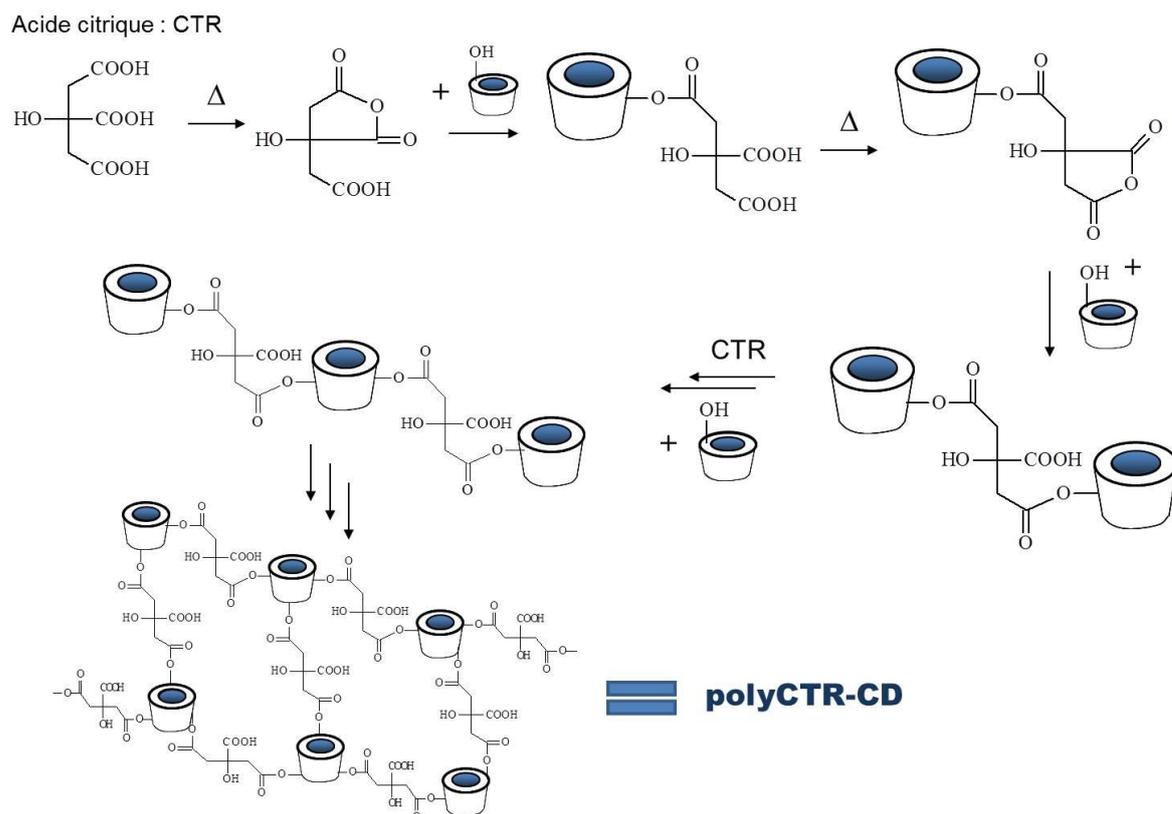


Figure 14: Schéma réactionnel de réticulation des CD par l'acide citrique

Grâce à la réticulation du polymère directement sur les fibres synthétiques, celui-ci est enrobé à la surface par interactions physiques solides comme visible en Figure 15. Dans le cas de fibres naturelles (telles que le coton), puisqu'elles possèdent effectivement des fonctions réactives en surface, on assimile l'enrobage à un greffage covalent entre les fibres et le polymère formé. Cette réaction dépend de plusieurs paramètres dont notamment la température de réticulation, la durée, la concentration des réactifs⁸⁷ mais également de la nature de l'agent réticulant et de sa réactivité.

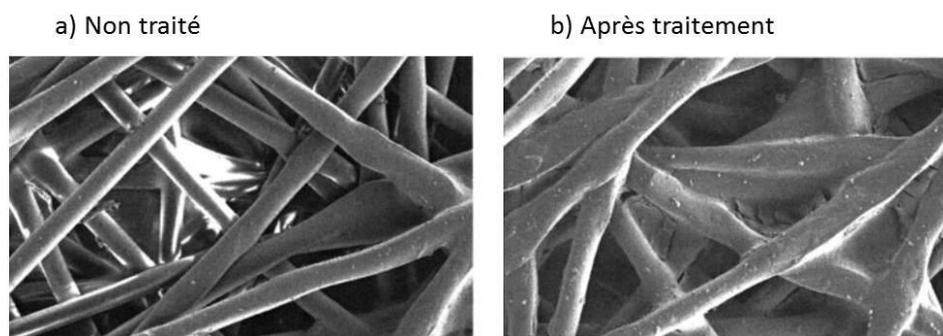


Figure 15: Image MEB de fibres de polyester a) non traitées, b) traitées avec le polymère réticulé formé à partir de l'acide et des CD⁸⁸

Le réseau réticulé obtenu est donc composé de CD et du polyacide utilisé pour la réticulation. Le textile dispose donc des cavités des CD et de fonctions acide, ce qui conduit à la fonctionnalisation

du textile par des molécules cages et des groupements réactifs qui, potentiellement, peuvent former des interactions ioniques avec d'autres composés. On peut donc envisager, grâce aux propriétés d'inclusion des CD, d'encapsuler de nombreuses molécules dans ces textiles traités, permettant leur libération une fois en contact avec l'environnement désiré.

De fait, de nombreux résultats concernant les biomatériaux aux propriétés accrues de piégeage et de libération prolongée d'antibiotiques ont été obtenus. Par exemple, ont été étudiés des implants à base d'hydroxyapatite pour les substituts osseux⁸⁹, des membranes PVDF pour la régénération des tissus en parodontologie⁹⁰⁻⁹², et dans une plus large mesure des implants textiles pour la chirurgie vasculaire^{52, 93-95} et pariétale^{96, 97}. Ces implants biocompatibles *in vitro* et *in vivo*⁹⁸ ont montré des propriétés très prometteuses en termes de complexation et de libération de molécules actives au niveau des dispositifs implantés, sur des temps prolongés, dépassant largement la période critique de colonisation bactérienne de 6h^{95, 99}.

Par ce traitement, il devient donc possible de piéger des molécules actives et autres médicaments en surface des textiles grâce aux propriétés des cyclodextrines et ce, quelque soit le support utilisé. On peut envisager alors un grand nombre de dispositifs textiles « actifs » utilisant cette technique pour apporter les différentes propriétés souhaitées.

1.3. Synthèse

Ainsi, si les textiles sont utilisés à tous les niveaux du traitement médical d'un patient, il est possible de modifier leur surface afin d'améliorer leur compatibilité. Il est en effet envisageable, par exemple, de créer des dispositifs permettant le ralentissement de la colonisation bactérienne des implants et donc diminuant les causes d'infections, et qui libèrent également des molécules actives directement au niveau des endroits à traiter.

Le principal désavantage de ces différents systèmes est que leur efficacité est complètement liée à la manière dont le principe actif est libéré. Cette libération est dépendante de la matrice dans laquelle le médicament est « emprisonné », ainsi que du médicament lui-même. Si elle est trop rapide, la totalité du principe actif sera libérée avant que l'infection soit stoppée. Si elle est trop lente, les taux peuvent ne pas être suffisants pour stopper l'infection dans un premier temps, et il est même possible que les bactéries développent une immunité vis-à-vis du principe actif si la dose libérée est inférieure à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) sur une longue durée¹⁰⁰.

S'il est difficile de déterminer un dispositif de libération idéal, au vu de toutes les molécules susceptibles d'être piégées dans autant d'environnements différents⁵³, le challenge est important. Lorsqu'ils sont maîtrisés, de tels dispositifs « actifs » permettent de répondre à de nombreuses

thématiques, aussi bien en termes de confort des patients au niveau de la prise de médicaments qu'en termes de simplicité pour les praticiens. Le traitement par les cyclodextrines apparaît d'ailleurs comme l'un des traitements surfaciques très prometteurs pour la complexation et la libération de telles molécules.

Une dernière technique en plein essor pour développer des systèmes actifs existe et n'a pas encore été développée au laboratoire UMET. Il s'agit du traitement couche-par-couche (Layer-by-Layer en anglais, abrégée LbL) qui autorise, par interactions ioniques, l'immobilisation sur une surface de couches alternées de polyélectrolytes cationiques et anioniques. Ces systèmes sont également étudiés et très largement envisagés dans la création de dispositifs actifs, puisqu'ils permettent de piéger des molécules actives au sein de l'édifice multicouche. Cette technique pourrait également compléter tous les systèmes déjà présentés ci-dessus, notamment le traitement de surface par les cyclodextrines, puisqu'en plus des propriétés des molécules cages, des groupements réactifs susceptibles de former des interactions ioniques avec d'autres espèces sont présents en surface. Le polymère de cyclodextrine présenté ci-avant, apparaît donc comme un bon candidat pour former un polyélectrolyte, c'est pourquoi il est utilisé au cours de cette étude.

Il paraît alors intéressant d'étudier les tenants et aboutissants de cette méthode « multicouche », ainsi que la possibilité de l'utiliser dans la réalisation de dispositifs actifs.

II. Les systèmes multicouches

Comme vu dans la première partie de ce chapitre bibliographique, le traitement de surface joue un rôle important dans le contrôle des interactions entre un dispositif et son environnement puisqu'il peut apporter des propriétés spécifiques à cette surface. Or, grâce à la technique LbL, il est possible de déposer de nombreuses couches de polymères à la surface des substrats et d'ainsi combiner plusieurs propriétés différentes pour un même support. Dans cette partie, la technique LbL sera présentée ainsi que son application aux biomatériaux.

II.1. La formation des films multicouches

II.1.1. Principe

L'assemblage de films minces a été élaboré au début du siècle dernier selon la technique de « Langmuir-Blodgett »¹⁰¹ présentée en Figure 16. a). La construction du film monocouche est permise par la déposition de molécules tensioactives ou amphiphiles à l'interface air / eau qui s'adsorbent sur un substrat. Cependant, l'inconvénient de cette méthode est qu'elle est liée à la topologie du substrat et à l'instabilité relative des films formés.

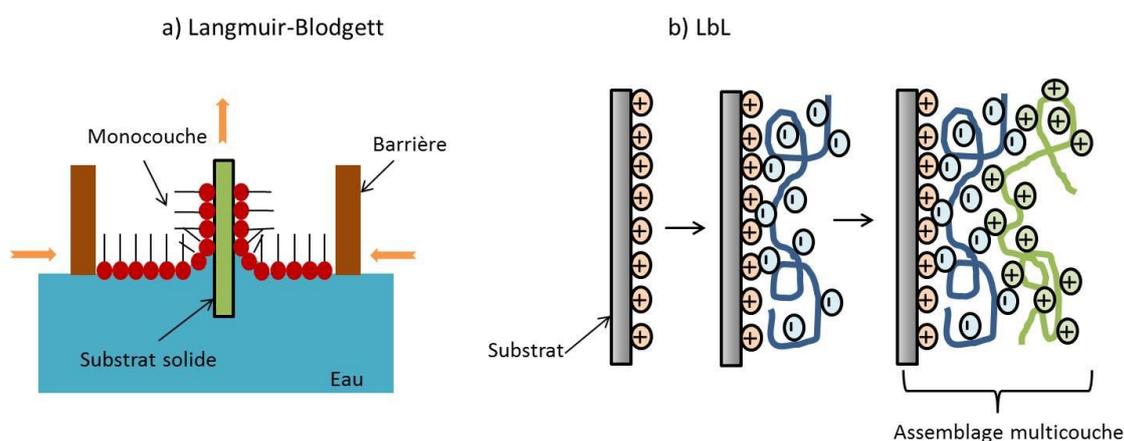
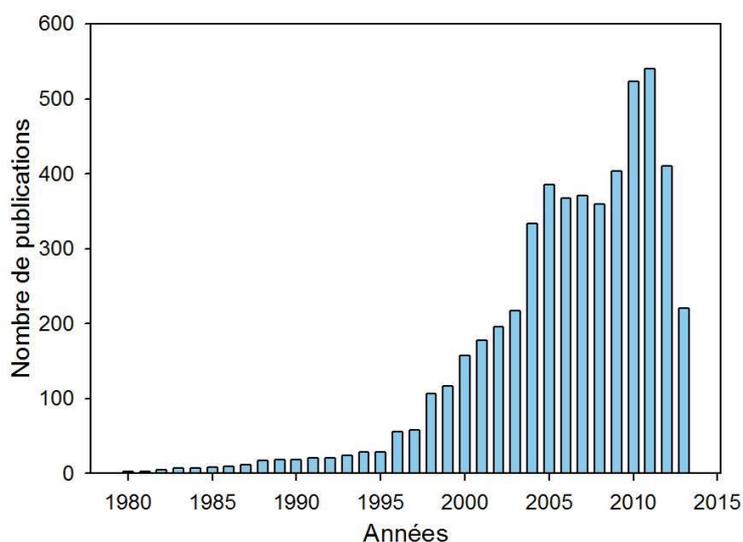


Figure 16: Schémas simplifiés d'assemblages de films minces par les techniques a) Langmuir-Blodgett et b) LbL

Au début des années 1990, G. Decher et son équipe ont développé la méthode d'assemblage LbL appliquée aux polyélectrolytes (PE)^{102,103} qui conduit à la formation de films multicouches (Figure 16. b)). Dès lors, cette technique est devenue un outil important de modification de surface de supports très variés¹⁰⁴ tels que le quartz¹⁰⁵, le verre¹⁰⁶, le coton^{107,108} ou encore la cellulose¹⁰⁹, comme

le présente l'histogramme ci-dessous, qui recense les travaux publiés par an sur la technique LbL utilisant des polyélectrolytes, à partir des années 1980.



Histogramme 1: Nombre de publications par an concernant les polyélectrolytes utilisés dans la technique LbL (source : Scopus, mots-clés : Layer by layer + polyélectrolytes)

Cette dernière technique présente l'avantage d'être rapide, facilement applicable avec des processus doux et biocompatibles (majoritairement dans l'eau) et ajustables à toutes sortes de substrats.

Le processus réside dans le dépôt alterné de polymères de charges opposées à la surface d'un substrat activé. Il est basé essentiellement sur les interactions électrostatiques entre les espèces anioniques et cationiques. Comme présenté en Figure 16. b), un substrat (chargé positivement dans cet exemple) est mis en contact avec une solution de polyanion (PE-) pendant un temps donné, ce qui conduit à l'adsorption de ce dernier sur la surface par interactions ioniques. L'excédent est ensuite éliminé par simple rinçage. Après rinçage, la surface apparaît chargée négativement car il y a surcompensation des charges positives initialement présentes¹¹⁰. Par conséquent, lorsque le substrat est mis en contact avec la solution suivante de polycation (PE+), celui-ci peut également interagir avec la surface et s'adsorber sur la couche précédemment déposée. L'alternance de charges au cours du processus a pu être mise en évidence par la mesure du potentiel zêta¹¹⁰⁻¹¹² et constitue le moteur de la construction des films multicouches. En effet, le processus peut être répété autant de fois que nécessaire pour obtenir le nombre de couches désiré à la surface.

Outre les interactions ioniques, des forces secondaires à courte distance interviennent également dans la formation de ces systèmes. Des études récentes ont permis d'étudier le rôle des interactions électrostatiques et leurs combinaisons avec d'autres interactions comme les interactions hydrogène ou hydrophobes. En effet, des films à base d'acide polyacrylique ont pu être formés à $\text{pH} = 3$, alors que la plupart des groupements acide sont non-ionisés. Les assemblages reposeraient alors essentiellement sur les liaisons hydrogène, mais présenteraient une très faible stabilité^{113,114}. Les interactions hydrophobes sont également à prendre en compte dans ce type de construction car il semblerait que les PE hydrophobes puissent aussi former des multicouches relativement stables¹¹⁵, et que les surfaces polymériques très hydrophobes et non chargées soient propices à la construction¹¹⁶.

II.1.2. Les procédés

Différentes méthodes de dépôt ont été développées au cours du temps pour mettre en contact le substrat et les différentes solutions de PE¹¹⁷. Elles sont décrites ci-dessous.

II.1.2.a) Trempage – «Dip coating»

Pour cette méthode, qui est la méthode « traditionnelle » de dépôt initialement développée par Decher *et al.*¹⁰², il s'agit de tremper successivement le substrat dans différents bains de PE (cf. Figure 17).

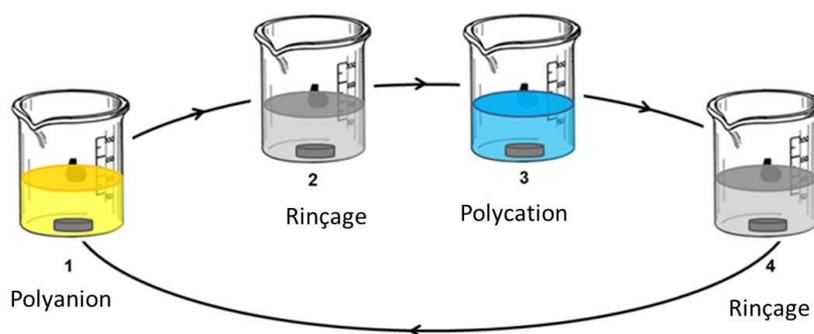


Figure 17

Figure 17: Principe de la technique de trempage pour la formation d'assemblages multicouches

Cette technique autorise un vaste choix de substrats, de même qu'elle permet facilement de varier les temps d'imprégnations et de rinçages, ou encore les taux de sel ou les pH des solutions. Les adsorptions par cette technique peuvent être assez rapides (de 5 à 60 min en général) dépendant des structures des PE utilisés^{106, 107}. Le rinçage est une étape nécessaire pour éliminer l'excès de PE

non adsorbé et éviter une possible floculation des polymères lors de la mise en contact avec le PE suivant. Cependant, cette procédure est assez longue malgré le développement de systèmes automatisés, et n'est pas facilement adaptable pour de très grandes surfaces ; ce qui explique qu'elle remplit assez difficilement le cahier des charges pour une application industrielle. D'autre part, les assemblages construits avec cette dernière méthode présentent des morphologies interpénétrées à l'interface entre deux couches et sont donc moins ordonnés par strates par rapport aux autres techniques présentées ci-après^{118,119}.

II.1.2.b) Centrifugation – « spin coating »

Cette méthode de centrifugation, dont le principe est donné en Figure 18, a été développée afin de réduire le temps de construction des multicouches et est très utilisée dans le milieu des semi-conducteurs¹²⁰.

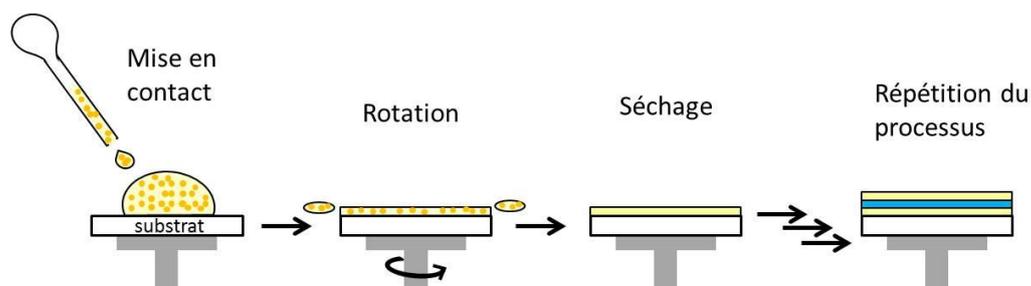


Figure 18: Principe de la technique de centrifugation pour la formation d'assemblages multicouches

Une solution de PE est déposée sur le substrat chargé, puis, sous l'effet de la rotation, celle-ci est uniformément étalée. L'excès de solvant est évaporé et l'étape précédente est répétée avec la solution de PE suivante. Le temps nécessaire pour la formation d'une monocouche est très rapide (< 1 min) et l'épaisseur et la rugosité de celle-ci dépendent de plusieurs paramètres dont la vitesse de rotation, la volatilité du solvant et la viscosité de la solution¹²¹. Par exemple, un faible taux de rotation ou une concentration élevée en PE induisent des quantités adsorbées plus importantes, ce qui permet dans une certaine mesure, de contrôler l'épaisseur des couches formées. De même que pour la technique de trempage, la centrifugation est difficilement applicable pour des grandes surfaces.

II.1.2.c) Pulvérisation – « Spray assisted coating »

Dans cette technique schématisée en Figure 19, les solutions sont pulvérisées de manière alternée sur le substrat vertical, permettant le drainage de l'excès de solution. L'étape de spray est suivie d'une petite période d'attente (20 à 30 s) permettant aux interactions de se faire. Les étapes

de rinçages peuvent être réalisées mais ne sont pas systématiques. La technique de spray a été reportée pour la première fois par Schlenoff *et al.*¹²².

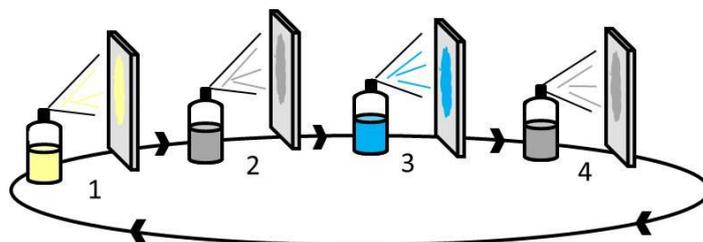


Figure 19: Principe de la technique de pulvérisation pour la formation d'assemblages multicouches

Les différents paramètres pouvant moduler les assemblages sont les temps et taux de spray, le pH, la force ionique et la concentration en PE¹¹⁷. Un des principaux avantages de cette technique est qu'elle est particulièrement rapide, simple à mettre en œuvre pour de grandes surfaces et à automatiser. De plus, il semblerait également qu'elle minimise les interpénétrations entre les couches successives¹²³. Le principal inconvénient pourrait venir du fait que le spray consomme une grande quantité de solution de PE, qui n'est plus réutilisable une fois pulvérisée.

D'autres techniques récentes existent encore telles que le dépôt dynamique (dynamic coating) ou la technique de démoillabilité (dewetting)¹¹⁷ qui ne seront pas développées ici car elles sont plus difficilement applicables au domaine des dispositifs médicaux.

Ainsi, il existe différentes méthodes utilisées pour préparer les assemblages multicouches regroupées sous l'appellation LbL, qui ont toutes un impact sur leur morphologie finale. La centrifugation sera utilisée pour préparer des couches très ordonnées, nécessaires, par exemple, dans le domaine photovoltaïque.

Ce projet présente une première étude ayant pour but de vérifier la faisabilité de tels systèmes multicouches sur les textiles traités par des cyclodextrines présentées dans la première partie. C'est pourquoi, la technique par trempage a été retenue. En effet, cette technique est la plus utilisée encore aujourd'hui, elle s'adapte à toutes sortes de substrats, de différentes formes ou matériaux, elle est aussi peu chère et ne nécessite pas d'équipements particuliers. Il est totalement envisageable, si la faisabilité est prouvée et le process maîtrisé, de tester la construction de multicouches avec les autres techniques afin de déterminer la plus efficace et la plus rentable.

II.1.3. Les paramètres de construction et leur influence

II.1.3.a) Régime de croissance des assemblages

Deux types de régimes de croissance ont été identifiés lors de la construction d'assemblages multicouches¹²⁴. Cependant, il est pour le moment impossible de prévoir par avance quel régime les systèmes présenteront, car ceux-ci sont dépendants d'une multitude de facteurs intervenant au cours de la construction.

Le premier est un régime linéaire, qui correspond à une évolution régulière des gains de masse observés après chaque dépôt, et donc conduit à une épaisseur de couche régulière. Les films ainsi formés présentent une structure stratifiée et dans ce cas, il existe une faible interpénétration entre couches adjacentes qui assure cette homogénéité d'épaisseur.

Le second est un régime exponentiel, qui correspond à une augmentation du dépôt avec le nombre de couches conduisant à des épaisseurs grandissantes en fonction du nombre de couches¹¹⁷. Cette croissance est liée à la diffusion d'au moins l'un des deux polyélectrolytes constituant le film au cours de la construction comme schématisé par Richert *et al.* et présenté en Figure 20¹²⁵. Lors du dépôt de la seconde couche de PE+ (étape B), ce dernier est également capable de diffuser au travers de la première couche (étape C). Lors du rinçage (étape D), le PE+ diffuse dans l'autre sens et une partie est éliminée avec le surplus. Lors du dépôt de la 3^{ème} couche (étape E), le PE- interagit à la fois avec la couche précédemment déposée et le PE+ diffusant à l'extérieur de l'assemblage, ce qui permet la formation d'une couche de PE+ plus épaisse grâce au phénomène de diffusion conduisant à une croissance exponentielle (étape F).

Ce type de film peut présenter une rugosité plus importante et des caractéristiques physico-chimiques proches de celles d'un hydrogel en raison de leur forte teneur en eau.

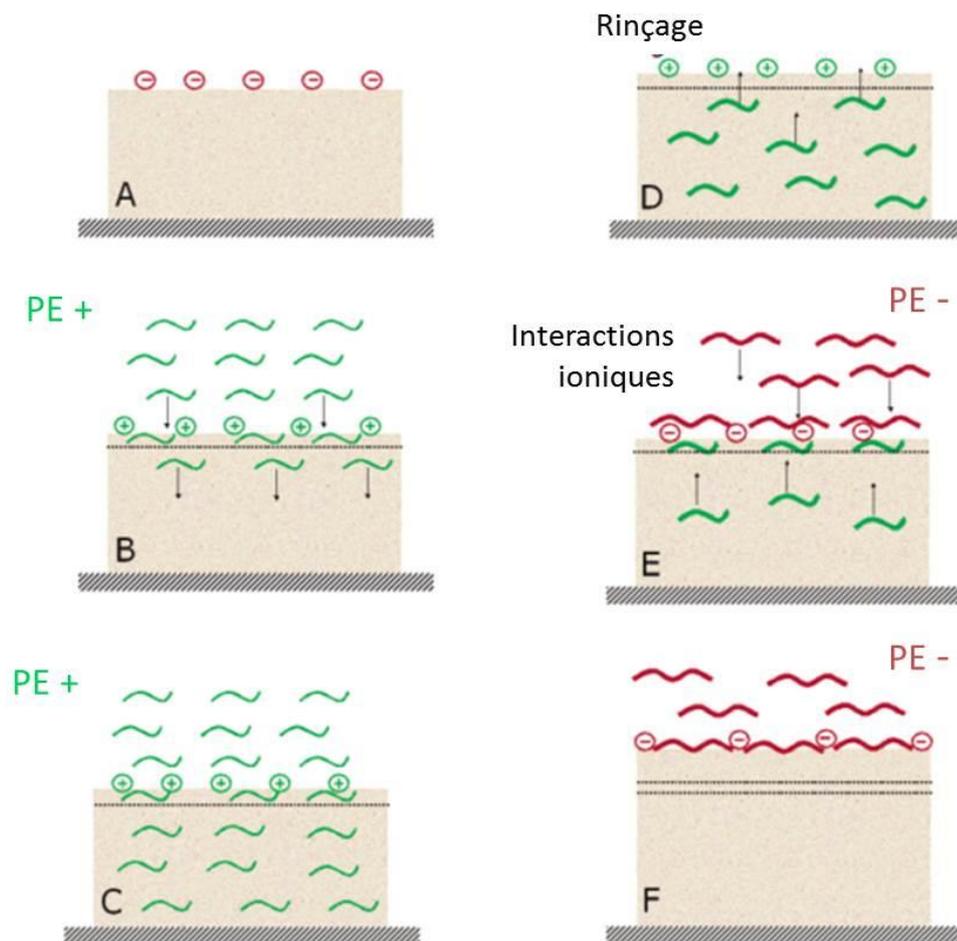


Figure 20 : Schématisation du mécanisme conduisant à une croissance exponentielle lors de la formation d'assemblages multicouches¹²⁵

Ces deux régimes de croissance peuvent être rencontrés pour une même paire de PE en modifiant les conditions de construction^{126,127}.

II.1.3.b) Paramètres de construction influençant la formation des assemblages

On peut donner en exemple les films de Salomäki *et al.*¹²⁸ qui présentent une croissance linéaire à température ambiante alors qu'à température élevée cette croissance passe à un régime exponentiel. De même, une augmentation de la force ionique des solutions de PE utilisées pour la construction permet d'observer par microbalance à quartz (QCMD, Quartz Crystal Microbalance with Dissipation) le passage d'un régime linéaire à un régime exponentiel à partir des mêmes PE (Chitosan et Hyaluronan), même si ceux-ci présentent des alternances de charges équivalentes par zétamétrie¹²⁵ (cf. Figure 21. a) et b)).

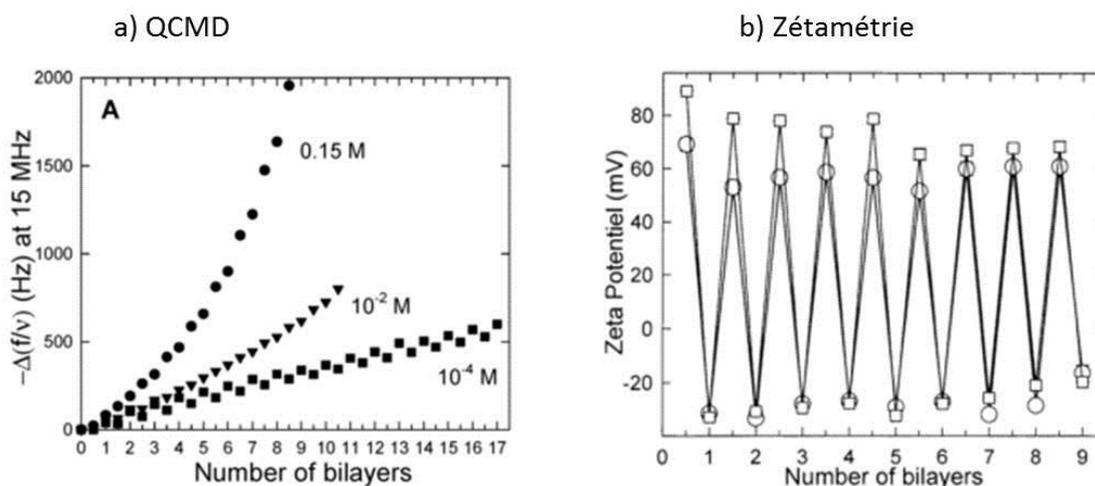


Figure 21 : a) Suivi QCMD de la construction d'assemblages multicouches à partir de solutions de PE (CHT et Hyaluronan) à différentes forces ioniques et b) Suivi par zétamétrie de ces mêmes assemblages, (○) : $[NaCl] = 0,15$ M et (□) : $[NaCl] = 10^{-4}$ M ¹²⁵

La température et la force ionique ne sont ici que des exemples, car de nombreux facteurs peuvent influencer la construction de ces assemblages. On peut notamment régler l'épaisseur des couches, la rugosité, la perméabilité des systèmes, ou la densité en modifiant certains paramètres. Ces différents facteurs influençant les propriétés des assemblages sont regroupés dans le Tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5 : Paramètres modifiables pour la construction des assemblages multicouches

Paramètres modifiables	Propriétés modifiées
Force ionique ¹⁰⁶⁻¹²⁹	Épaisseur, rugosité
pH ¹³⁰⁻¹³¹⁻¹³²	Épaisseur, densité
Température ¹²⁸	Épaisseur
Masse molaire des PE ¹³³	Perméabilité
Nombre de couches, dernière couche ¹⁰⁶	Mouillabilité

Depuis les premiers développements de la technique LbL, la teneur en sel dans les solutions de PE est reconnue comme un facteur important influençant la déposition des PE. Une augmentation de la force ionique provoque un changement de conformation des PE en solution. Au lieu de s'adsorber dans une conformation plane comme c'est le cas en absence de sel, à plus haute force ionique ils s'adsorbent dans une conformation dite de « boucle » ¹⁰⁵, conduisant à des épaisseurs de couches plus importantes et le passage d'un régime de croissance linéaire à exponentiel. De fortes

conditions ioniques augmentent également la rugosité de l'assemblage¹⁰⁶. Cependant, si la force ionique est vraiment trop élevée, les effets d'écran induits par le sel sont plus importants que les interactions ioniques, empêchant la formation des assemblages. De plus, de telles conditions induisent un effet de gonflement, ce qui peut causer la déstructuration des couches déjà formées¹³⁴.

En ce qui concerne le pH, le taux de charge des PE dépend fortement du pH de la solution environnante et c'est un autre paramètre facilement modifiable pour moduler la morphologie et les propriétés des assemblages. Les films peuvent être construits dans une large gamme de pH, sous contrainte qu'elle autorise l'ionisation des groupements des PE. En jouant sur ce paramètre, il est possible de déposer des couches plus ou moins fines¹³² puisque le PE présentera plus ou moins de charges disponibles pour former les interactions. Les polyélectrolytes faibles par exemple, sont très dépendants des petits changements de pH lors du processus d'assemblage, c'est pourquoi les solutions de rinçages sont souvent ajustées aux pH des solutions de PE¹³¹.

D'une manière générale, les assemblages construits à hautes températures sont plus épais que ceux construits aux plus faibles températures. Il semblerait que ces différences soient attribuées à l'augmentation de la diffusion d'un des deux PE au sein de l'assemblage¹²⁸.

La masse molaire des PE utilisés permet de moduler la perméabilité des assemblages, ce qui est un paramètre important dans l'utilisation de ceux-ci pour la libération de molécules au cours du temps. Il a également été étudié que le nombre de couches et le choix de la dernière couche influencent aussi les propriétés des assemblages. La dernière couche en effet, permet de déterminer la charge globale de l'assemblage, ce qui a son importance au niveau de la colonisation bactérienne par exemple¹³⁵, tandis que le nombre de couches peut jouer sur la rugosité et la mouillabilité.

Ainsi, il y a de nombreux facteurs à tester et à optimiser pour donner aux assemblages multicouches les propriétés désirées. Certains facteurs, comme la température, peuvent être plus compliqués à mettre en pratique selon la technique de dépôt utilisée, tandis que d'autres, comme la force ionique ou le pH, sont plus faciles à mettre en œuvre. Cependant, on a pu voir par exemple, qu'une haute force ionique déstructurait rapidement les assemblages, c'est pourquoi des techniques pour renforcer la cohésion des assemblages et ralentir leur destruction ont été étudiées.

II.1.4. Stabilisation des films

II.1.4.a) Techniques de stabilisation

Les films multicouches sont stimulables, puisque leurs structures peuvent se réarranger sous stimulus externe comme un changement de pH, de température ou de force ionique et c'est pourquoi certains sont très fragiles et peu résistants à des changements d'environnement. En effet, le milieu environnant peut présenter une haute force ionique et des pH changeants par exemple. Il apparaît alors nécessaire de trouver un moyen de maintenir l'intégrité des assemblages afin d'améliorer leur tenue sur le support.

En effet, la dégradation des assemblages peut être provoquée par de nombreux phénomènes dans les milieux comme une dégradation enzymatique¹³⁶ ou électrochimique¹³⁷, par un changement de température¹³⁸ et plus important encore par une augmentation de la force ionique¹³⁴.

Dans un premier temps, il semblerait que le séchage intermédiaire entre chaque étape d'imprégnation confère de meilleures propriétés aux assemblages en termes de qualité et de stabilité^{139,140}. En effet, ces séchages permettent de diminuer la rugosité de surface mais également assurent une meilleure imperméabilité à l'ensemble, empêchant l'infiltration de la solution lors du dépôt suivant. En éliminant ces réactions, les films obtenus sont plus denses et plus compacts avec des épaisseurs plus faibles et leur durabilité est augmentée.

Par ailleurs, récemment, la possibilité de contrôler le taux de dégradation *in vitro* et *in vivo* par réticulation chimique a été démontrée¹³⁶. La réticulation, via des liaisons covalentes, est utilisée pour ralentir la biodégradation des assemblages multicouches ou pour permettre des propriétés de libération prolongée¹⁴¹⁻¹⁴⁵. Les liens covalents formés permettent d'obtenir une meilleure stabilité des assemblages couplée à une dégradation ralentie en milieu physiologique.

On peut distinguer trois principaux procédés de réticulation couramment utilisés :

- La réticulation thermique, qui consiste à placer le film à haute température pendant une certaine durée.
- La réticulation chimique, qui utilise différents agents réticulant afin de réaliser des « ponts » entre les groupements réactifs des PE. Selon l'agent choisi, les groupements réactifs ne sont pas les mêmes.
- La photo-réticulation, qui fait intervenir un agent photo-sensible incorporé dans le film. L'irradiation à la longueur d'onde convenable permet la réticulation du film.

Différents exemples de ces réticulations sont donnés dans le Tableau 6 suivant, ainsi que leurs avantages et inconvénients respectifs.

Tableau 6: Les techniques de réticulation utilisées sur les films multicouches

Techniques de réticulation	Exemples	Avantages	Inconvénients
Réticulation thermique	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Amine et acide carboxylique¹⁴⁶ (130 °C) ✓ Imine et acide carboxylique¹⁴⁷ (90°C) ✓ Groupement carboxylique¹⁴¹ 	<p>Facile à mettre en œuvre</p> <p>Applicable à de nombreux systèmes</p>	<p>Nécessite la stabilité des assemblages à hautes températures</p> <p>Séchage préalable des films</p>
Couplage chimique	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Glutaraldéhyde pour des films héparine/albumine¹⁴⁸ ✓ Carbodiimide pour des groupements amine et carboxylique^{149,145} ✓ Génipine pour les fonctions amines¹⁴³ 	<p>Réalisable à température ambiante</p> <p>Possibilité de contrôler le taux de réticulation</p>	<p>Risque de toxicité par l'agent de couplage</p> <p>Possible dénaturation de composés actifs inclus dans les assemblages</p>
Photo-réticulation	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Modification d'un PE par les groupements vinylbenzyl¹⁵⁰ ✓ Modification d'un PE par la benzophénone¹⁵¹ 	<p>Possibilité de réaliser des motifs</p>	<p>Nécessite une modification chimique des PE</p>

Dernièrement, la réticulation à la génipine pour la réticulation des fonctions amine présentes dans de nombreux polyélectrolytes apparaît très séduisante puisqu'elle utilise une molécule naturelle et reste relativement simple. C'est cette dernière technique de stabilisation des assemblages en particulier qui sera étudiée dans ce projet.

II.1.4.b) Réticulation par la génipine

En effet, la génipine est un agent de couplage naturel soluble dans l'eau, issu du fruit du *gardénia*, et est souvent utilisée pour réticuler des films multicouches, et plus particulièrement pour les biomatériaux, de par son origine naturelle et sa biocompatibilité après réaction^{98, 143, 144, 152, 153}.

Si la génipine est relativement chère (86,30 € pour 25 mg, Sigma-Aldrich) et toxique lorsqu'elle n'est pas réticulée¹⁵⁴, cette toxicité est éliminée dès lors que tout le réactif est consommé. Il a d'ailleurs été démontré que la génipine possède un plus haut taux de biocompatibilité et une

cytotoxicité diminuée par rapport à d'autres agents réticulants tels que le glutaraldéhyde, le formaldéhyde ou les époxydes.

Une coloration bleue foncée apparaît lorsqu'elle réagit avec des groupements amino¹⁵⁵, et deux mécanismes sont proposés pour expliquer cette réaction (cf. Figure 22). Le premier propose la réticulation par une seule molécule de génipine¹⁵⁶ alors que le second propose un mécanisme à partir de deux molécules de génipine reliées entre elles par ouverture de cycle¹⁵⁷.

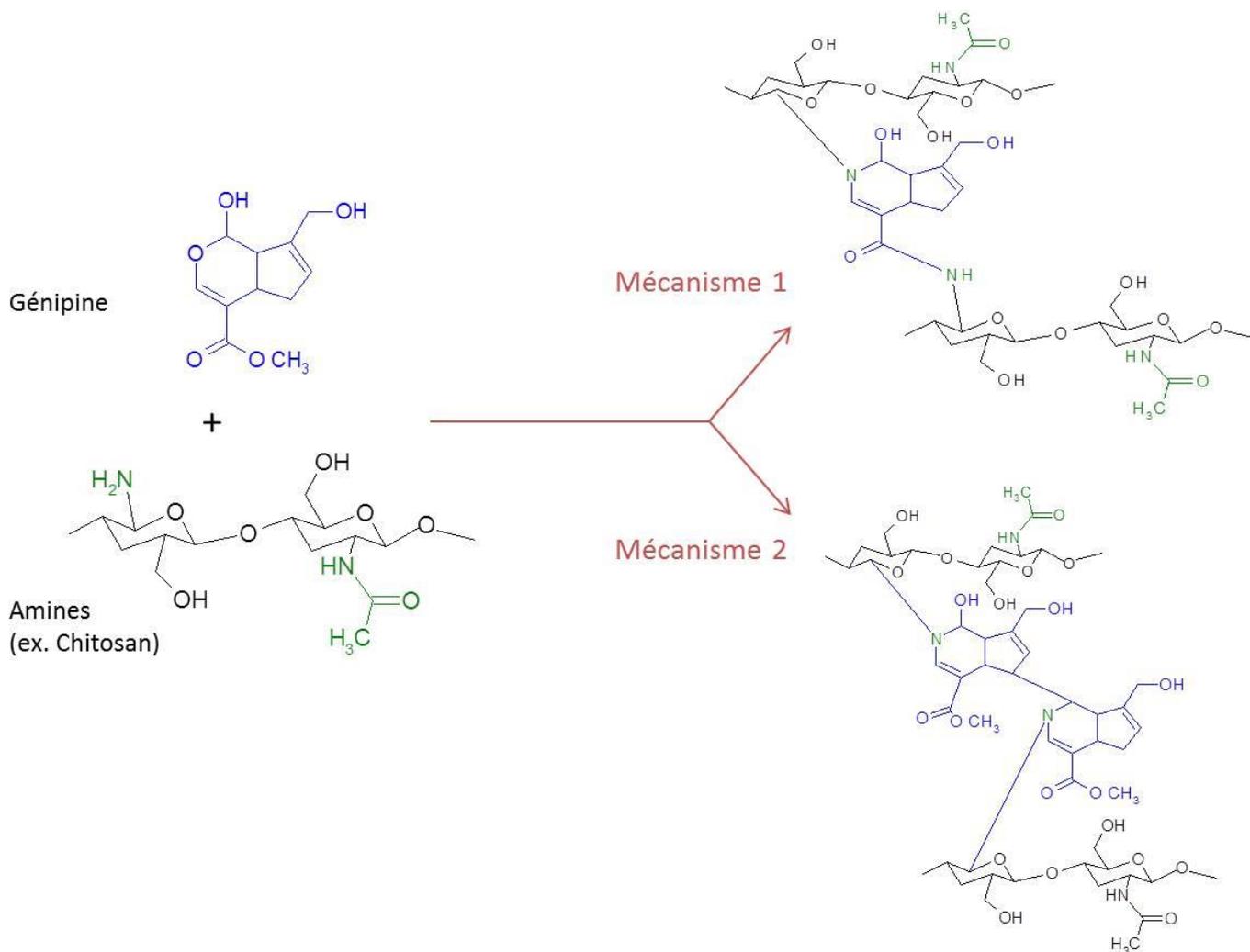


Figure 22: Mécanismes proposés pour la réticulation des groupements amine par la génipine^{156,157}

La réaction de la génipine avec le chitosan notamment a pu être mise en évidence par analyse infra-rouge¹⁵⁶ (cf. Figure 23.a)) : l'absorbance des pics à 1414 (attribué à une élongation de cycle de la génipine) et 1550 cm^{-1} (attribué aux groupements amine protonés du CHT) diminuent tandis que celui à 1092 cm^{-1} (élongation C-O ou C-N) augmente. De même par UV-visible, on observe au pH de travail neutre, la diminution du pic caractéristique de la génipine à 240 nm accompagnée de

l'augmentation de celui à 290 nm attribué à l'ouverture de cycle lors de la réaction¹⁵⁷ (cf. Figure 23.b)).

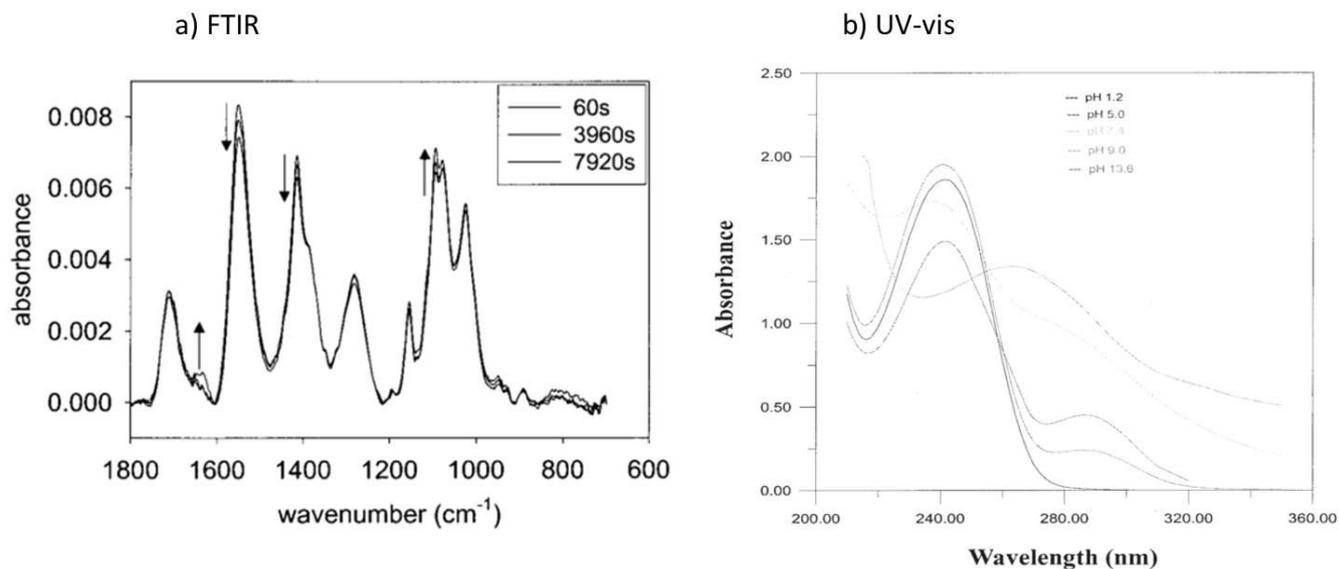


Figure 23 : Etude de la réticulation du CHT par la génipine a) Suivi de la cinétique par FTIR¹⁵⁶, b) Etude du pH de réticulation par UV-visible¹⁵⁷

Dans tous les cas, la réticulation par la génipine permet d'augmenter la cohésion des assemblages multicouches qui affichent une résistance contre la dégradation enzymatique plus élevée par exemple¹⁵⁸. De plus, le taux de réticulation peut être contrôlé en modulant la concentration d'agent réticulant présent dans le système.

Cette première partie a permis de présenter les assemblages multicouches formés par la technique LbL, ainsi que les différentes techniques de dépôts possibles, les facteurs influençant la construction mais aussi les différents moyens de stabiliser ces fragiles assemblages en vue d'une utilisation dans des milieux considérés agressifs tels que les milieux physiologiques. Il apparaît donc possible d'utiliser une large gamme de supports et de PE pour réaliser de tels assemblages. Par ailleurs, en modulant les concentrations, le pH des solutions ou la température de formation, entre autres, il est possible de jouer sur les épaisseurs et morphologies des films multicouches formés afin d'obtenir les propriétés désirées.

Ces films multicouches sont étudiés en vue d'applications dans un grand nombre de domaines. Cependant, cette étude vise à utiliser la technique pour des applications biomédicales dans le domaine des dispositifs médicaux notamment. C'est pourquoi, désormais, il est important de démontrer leurs potentielles utilités et promesses dans le domaine des applications médicales.

II.2. Applications aux biomatériaux

De par sa simplicité d'utilisation, cette technique de LbL permet d'envisager de nombreuses applications pour le design de nouveaux biomatériaux. Cette technique est en effet régulièrement étudiée et les différentes stratégies utilisées pour ce faire sont décrites dans ce paragraphe.

II.2.1. Choix des polyélectrolytes

II.2.1.a) PE synthétiques et naturels

La construction d'assemblages multicouches permet d'utiliser une grande variété de polyélectrolytes. Cependant, pour envisager une application médicale, le choix des PE est un challenge important. En effet, pour ces applications, le support est choisi inerte ou biocompatible et il s'agit de ne pas ajouter de toxicité à l'ensemble lors de la construction des assemblages, tout en apportant les propriétés désirées. Pour ce faire, on peut envisager des PE synthétiques, tels que le poly (acide acrylique) ou des PE naturels, tels que l'héparine.

Le Tableau 7 suivant présente les avantages et inconvénients de ces deux catégories de PE.

Tableau 7: Avantages et inconvénients des PE naturels et synthétiques pour la construction d'assemblages multicouches

	PE synthétiques	PE naturels
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Large choix de structures, de densités, de charges... ✓ Flexibilité ✓ Possibilité de travailler avec de larges gammes de pH et de force ionique ✓ Modifications chimiques faciles ✓ Abondants et peu chers 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Issus de ressources renouvelables ✓ Propriétés structurales intéressantes (interactions avec l'eau, hydrogel...) ✓ Biodégradabilité et biocompatibilité pour la plupart
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Non biodégradables pour la plupart ✓ Toxicité possible ✓ Pas d'activités particulières 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Origine naturelle : pureté et polydispersité optimales après traitements ✓ Gammes de pH et de force ionique limitées par la solubilité

Dans les études des assemblages multicouches pour applications biomédicales (en régénération de tissus notamment) on retrouve fréquemment l'utilisation de ces deux catégories de

polymères. Le Tableau 8 suivant regroupe, en une liste non exhaustive, les différents couples de PE régulièrement utilisés pour ce type d'applications.

Tableau 8 : Liste non exhaustive des différents PE synthétiques et naturels étudiés pour des applications biomatériaux

PE +	PE -	Références
Poly(allylamine hydrochloride) (PAH)	Poly(styrène sulfonate) de sodium (PSS)	111, 128, 159-161
PAH	Poly(acide acrylique) (PAA)	162, 163
Chitosan (CHT)	Acide hyaluronique (HA)	136, 164-166
CHT	Héparine (HEP)	130, 167
CHT	Poly(L-glutamic acid) (PGA)	168
CHT	Dextrane	169, 170
CHT	Alginate (ALG)	171
Albumine	HEP	172
Poly(L-lysine) (PLL)	HA	173
PLL	ALG	174
PLL	PGA	175, 176
PLL	HEP	177
PLL	PGA	135, 178, 179
Collagène (COL)	HEP	180, 181
COL	HA	180
COL	Chondroïtine sulfate (CS)	180
Poly(acrylamide) (PAAm)	Poly(méthacrylique) (PMA)	141

De nombreux films à base de polymères synthétiques sont testés pour contrôler l'adhésion et la prolifération cellulaire. Ont été utilisés par exemple, le poly(styrène sulfonate) de sodium (PSS), le poly(acide acrylique) (PAA), ou le poly(allylamine hydrochloride) (PAH). L'intérêt principal d'utiliser des PE synthétiques provient de la possibilité d'ajuster certains paramètres et de la facilité de les modifier chimiquement si nécessaire. L'assemblage le plus étudié est de loin celui composé de PSS/PAH^{111,128,159}, sur lesquels ont été cultivés tous types de cellules, des fibroblastes¹⁶⁰ aux endothéliales¹⁶¹. Cependant, des études *in vivo* ont montré que certains PE synthétiques étaient

potentiellement cytotoxiques^{182,183} alors que d'autres films, implantés chez le lapin, ont montré une très bonne compatibilité jusqu'à 12 semaines¹⁸⁴. Ainsi, des études systématiques sont à réaliser au cas par cas avant d'envisager l'utilisation de ces PE synthétiques dans les assemblages.

L'une des familles de PE naturels qui est la plus étudiée dans le domaine des assemblages multicouches est la famille des polysaccharides¹⁸⁵ regroupant notamment les dextrans (DEX), les alginates (ALG), et le chitosan (CHT). Ce sont d'ailleurs ceux-ci qui sont à l'origine de la découverte de la croissance exponentielle des films lors des dépositions successives. Ils peuvent présenter des charges négatives apportées par des groupements carboxylates (COO^-) et sulfate (SO_3^-) ou des charges positives grâce aux groupements ammonium (NH_3^+). Cette famille peut se scinder en deux catégories selon que leur origine est végétale ou animale. Ces PE naturels, grâce à leurs activités biologiques intrinsèques et leur possible biodégradabilité, sont couramment utilisés dans la formation d'assemblages par LbL. Par exemple, l'héparine (HEP) est utilisée pour ses propriétés anti-thrombogéniques et l'acide hyaluronique (HA) pour sa capacité de rétention d'eau. Des assemblages 100 % d'origine naturelle ont ainsi pu être formés et ont montré de bonnes propriétés d'hémocompatibilité par exemple^{181,170}. Le choix d'un polysaccharide cationique sans modification chimique est extrêmement restreint, et le CHT est souvent utilisé. Grâce à ses nombreuses propriétés (biocompatibilité, antimicrobien)¹⁸⁶, il est le polysaccharide le plus courant dans les films construits par LbL¹⁸⁷.

II.2.1.b) Le chitosan

L'utilisation du CHT, dont la représentation est donnée en Figure 24, est très fréquente pour toutes sortes d'applications biomédicales¹⁸⁸. Il est obtenu par désacétylation de la chitine prélevée dans les carapaces de crustacés, lorsque le degré de désacétylation (DD) est supérieur à 50%.

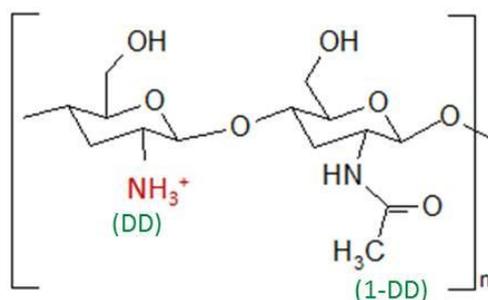


Figure 24: Représentation des unités de répétition du chitosan

Le CHT est insoluble dans l'eau mais est soluble en milieu acide grâce à la protonation de son groupement amine. Il est régulièrement utilisé dans des assemblages multicouches sur des surfaces solides en tant que PE+^{130,189}. En effet, ce polymère naturel, issu des carapaces de crustacés ou des parois de champignons, est très apprécié pour son activité bactérienne intrinsèque¹⁹⁰. Il représente donc un candidat idéal pour des applications biomatériaux¹⁹¹⁻¹⁹³ et est notamment très utilisé seul pour la reconstruction ou régénération tissulaire¹⁹⁴. Le Tableau 9 suivant donne une liste non exhaustive des différents assemblages multicouches réalisés avec le CHT pour des applications biomatériaux ainsi que leurs potentielles applications.

Tableau 9 : Assemblages multicouches à partir de CHT pour applications biomatériaux

Types de films	Supports	Applications
CHT / Acide hyaluronique	Titane	Reconstruction osseuse ¹⁶⁴
	Textile (soie, polyester)	Fils de sutures ¹⁶⁵
	Métal (stents)	Prévenir l'adhésion cellulaire ¹⁶⁶
	PMMA	Dentaire ¹³⁶
CHT / Heparine	Métal (stents)	Ingénierie vasculaire ¹⁶⁷
	PET	Tissu neuronal, support anti adhésif et antibactérien ¹³⁰
CHT / Poly(L-glutamic acid)	Quartz ou silicone	Augmenter l'adhésion cellulaire ¹⁶⁸
CHT / Dextrane	Quartz	Propriétés anticoagulantes ¹⁷⁰
CHT / Alginate	PLGA	Ciblage de cellule ¹⁷¹

Dans ce projet, le polyélectrolyte anionique est déjà déterminé, et il s'agit d'un polymère de cyclodextrines comme présenté au paragraphe **1.2.6.b)**. Puisque nous visons des applications médicales, au vu de toutes ses propriétés et de sa courante utilisation à ces fins, il est apparu naturel de choisir le CHT comme polycation dans la construction de nos assemblages multicouches.

Une fois que les polyélectrolytes adaptés et compatibles sont choisis, il s'agit d'utiliser les propriétés de piégeage de ces assemblages. Comme présenté en **1.2**, la finalité est d'obtenir des systèmes capables de libérer des molécules actives directement au niveau des zones ciblées. A partir des assemblages multicouches, il est effectivement possible d'obtenir de tels systèmes en suivant différentes stratégies qui sont proposées ci-après.

II.2.2. Polyélectrolytes « bio-actifs »

La première voie utilise des protéines, des enzymes ou des molécules présentant une activité biologique directement au sein de l'architecture des assemblages, puisqu'elles se substituent à l'un des deux polyélectrolytes (cf. Figure 25.a)) à un ou plusieurs niveaux de l'édifice. Dans ce cas, selon sa charge, la molécule solubilisée correspond à la totalité du polyanion / polycation (ou à une partie de celui-ci si elle est couplée avec lui par liaisons covalentes), et est directement utilisée dans la construction des assemblages comme présenté en Figure 25.a).

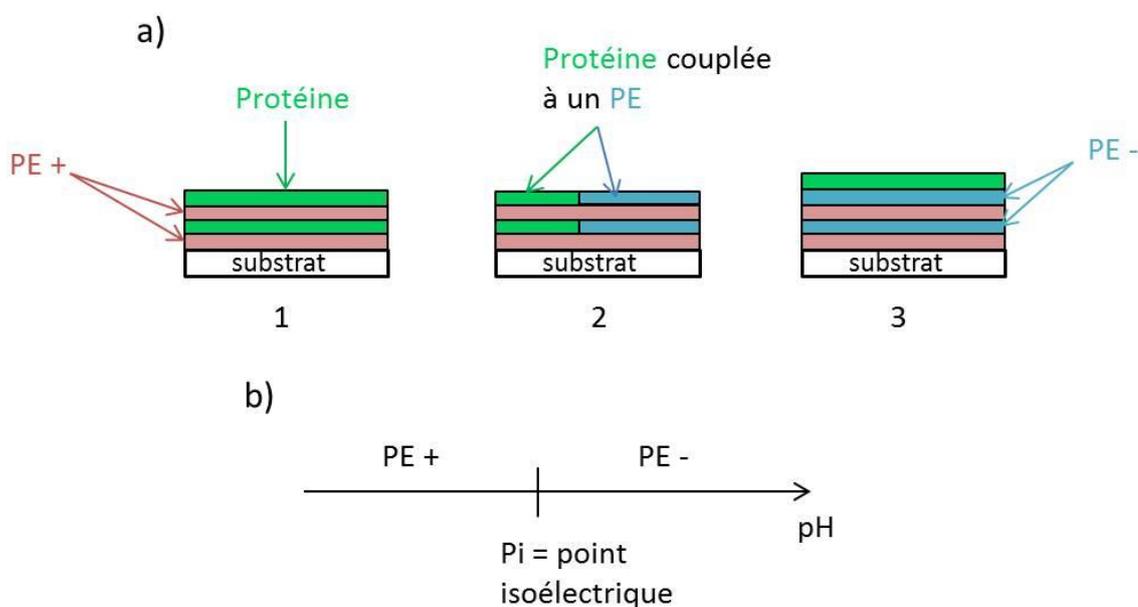


Figure 25 : a) Possibilité d'inclusion d'une protéine au sein d'un assemblage multicouche, b) propriétés polyampholyte des protéines

En effet, la plupart des protéines sont polyampholytes (cf. Figure 25.b)), et elles ont tendance à s'adsorber préférentiellement sur des surfaces de charges opposés¹⁹⁵. Elles peuvent donc se comporter comme des PE (+ ou -) lorsqu'elles sont mises en solution. De nombreux films multicouches formés à partir de poly(L-lysine) (PLL) ont été étudiés^{129,196,197} notamment. L'activité est ensuite délivrée par la déstructuration successive des différentes couches au cours du temps ou par stimuli externe.

Brynda *et al.* ont par exemple utilisé la première technique présentée en Figure 25 pour élaborer des films à base d'albumine et d'héparine, à propriétés anticoagulantes pour le recouvrement de prothèses en Dacron, qui sont stables *in vivo* pendant 3 semaines¹⁴⁸. On peut même imaginer former des assemblages qui ne seraient composés que de deux protéines de charges opposées, avec la formation de couches relativement uniformes¹⁹⁸.

Le peptide court d'une hormone appelée α -MSH (alpha-melanocyte-stimulating hormone) a été couplé avec la PLL ou le polyglycolic acid (PGA) dans des assemblages PLL/PGA (Figure 25, technique 2) qui ont montré l'annihilation des effets de l'une des bactéries qui stimulait une réponse inflammatoire des cellules¹⁹⁹. Cette seconde technique présentée en Figure 25 a également été utilisée par Thierry *et al.* qui, par liaisons covalentes, ont greffé du Paclitaxel à la surface d'un polymère de HA puis l'ont utilisé pour la construction de films multicouches pour le traitement des cancers du sein ou des ovaires²⁰⁰.

La dernière technique (Figure 25, technique 3), qui consiste à utiliser la protéine comme dernière couche, a été utilisée par Wittmer *et al.* qui ont déposé une couche finale de fibronectine sur un assemblage PLL/DEX pour contrôler l'adhésion cellulaire²⁰¹.

Il est par ailleurs démontré que les interactions ioniques nécessaires pour l'adsorption d'une protéine sont tout de même plus longues que celles utilisées usuellement (60 min contre 15 min respectivement). Par exemple, de l'immunoglobuline (IgG) introduite dans un assemblage conserve toute son activité et le film possède une reconnaissance spécifique vis-à-vis de l'anti-IgG¹⁵⁹. Lvov *et al.* ont même réussi à construire des assemblages multicouches par alternance de PE et d'un virus chargé en obtenant jusqu'à 60 couches sur un substrat en verre²⁰², montrant qu'il était possible d'introduire une espèce perturbante dans le système et de restaurer un film homogène après 2 bicouches. Cependant, le temps d'imprégnation est long (1h) et la déposition du virus est imparfaite, conduisant à une recouvrance incomplète de la surface.

L'une des principales applications de cette technique est la libération de fragments d'ADN directement au niveau des dispositifs implantés²⁰³. En effet, les brins d'ADN présentent des charges négatives en surface, et il est alors possible de réaliser des films multicouches à base de polymères cationiques/ADN comme polyélectrolytes et de permettre une libération progressive et donc une thérapie génique localisée²⁰⁴⁻²⁰⁶.

De nombreux désavantages sont toutefois à prendre en compte dans cette démarche. Premièrement, pour former les assemblages par interactions ioniques, les protéines doivent présenter des groupements ionisés en solution. Cela réduit le champ des possibilités au niveau des pH de travail ($\text{pH} \ll \text{Pi}$ ou $\text{pH} \gg \text{Pi}$). De plus, l'adsorption de molécules implique majoritairement des interactions très faibles qui peuvent conduire à des désorptions et libérations très rapides. Il a également été remarqué qu'un tel processus pouvait dénaturer les protéines et réduire leur activité biologique, c'est pourquoi le choix des conditions opératoires est assez compliqué.

De fait, une autre stratégie est étudiée afin d'inclure une molécule active dans les assemblages sans qu'elle se substitue à l'un des deux polyélectrolytes. Il s'agit par exemple d'utiliser les propriétés de complexation de certaines molécules, afin de réaliser des polyélectrolytes à

propriétés d'encapsulation, qui pourront complexer la molécule active et la libérer au cours du temps. Cette stratégie, qui est celle que nous allons suivre dans cette étude, est présentée dans la partie suivante.

II.2.3. Assemblages multicouches comme réservoirs de principes actifs

Avec cette technique, l'assemblage multicouches est utilisé comme un réservoir de molécules actives²⁰⁷. Elle utilise notamment les propriétés de complexation d'une molécule hôte présente au niveau de l'un des deux polyélectrolytes ou l'emprisonnement au sein du réseau polymère. En effet, on peut envisager de charger le système de deux manières différentes. La première utilisant l'un des PE comme réservoirs de molécules actives, par complexation avec une molécule hôte par exemple, et la seconde utilisant un assemblage multicouches déjà construit mis en présence de principes actifs (PA), qui se trouvent piégés dans l'assemblage par diffusion au travers des couches. La libération prolongée et contrôlée se fait ensuite par dégradation successive des couches (cf. Figure 26).

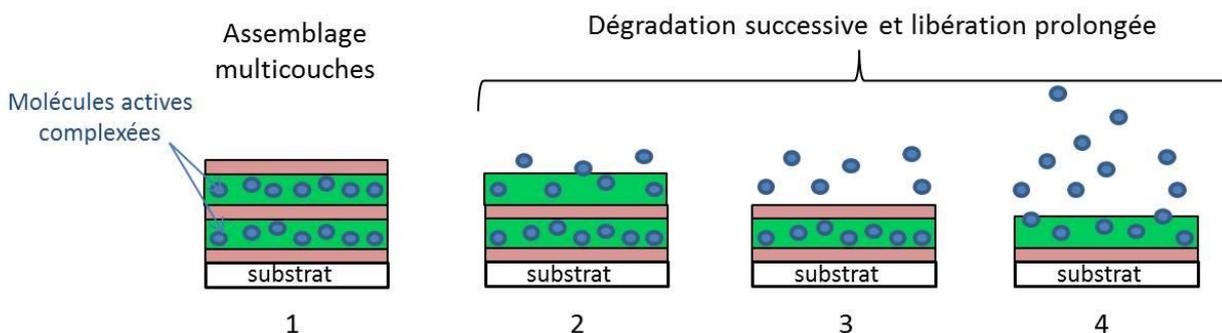


Figure 26 : Schématisation de la complexation et de la libération de molécules actives dans les assemblages multicouches

Cette technique de réservoir est utilisée à la fois pour contrôler la libération des PA, augmenter leur stabilité et solubilité, et augmenter les propriétés des excipients communément utilisés. Puisqu'aucun lien covalent n'entre en jeu dans la construction de tels systèmes, les molécules actives restent intactes, sans dénaturation ou perte de leur activité. De plus, les quantités libérées sont contrôlables en modulant le nombre de couches à la surface ou encore la concentration de PA introduite.

Crouzier *et al.* ont ainsi formé un assemblage multicouches à base de PLL/HA, choisi pour des épaisseurs de couches importantes, qu'ils ont utilisé comme réservoir pour libérer la protéine rhBMP-2 couramment utilisée dans la reconstruction osseuse¹⁷⁷, plutôt que de l'utiliser couplée à un PE, comme cela avait déjà été fait mais présentant de faibles résultats de libération²⁰⁸. Des

nanoparticules d'argent ont également pu être piégées dans des assemblages LbL^{209,210} par stabilisation avec l'un des PE utilisés.

De nombreuses études portent par ailleurs sur le piégeage de molécules actives au sein des assemblages multicouches et la libération de celles-ci par stimulus, comme un changement de pH²¹¹, de force ionique²¹² ou de température²¹³ permettant de libérer des colorants respectivement du bleu de méthylène, du pyrène ou encore de la rhodamine B pour simuler la libération de médicaments.

En particulier, ce type de systèmes multicouches est régulièrement étudié pour la formation de nanocapsules dans lesquelles il est possible d'encapsuler le principe actif²¹⁴. L'assemblage LbL est construit autour d'un cœur solide qui est ensuite détruit (par sonication par exemple), conduisant à la formation d'une capsule vide qu'il apparaît possible de charger en molécules actives peu solubles ou insolubles²¹⁵.

Puisque ce projet a pour but d'utiliser les propriétés d'inclusion des cyclodextrines au sein d'assemblages multicouches, il est utile de savoir si ces molécules cages et leurs propriétés ne sont pas altérées une fois incorporées dans ces systèmes.

Plusieurs systèmes utilisant cette seconde stratégie et des molécules de cyclodextrines ont été étudiés. On peut citer par exemple l'étude d'Auzély-Velty pour modifier chimiquement le CHT en greffant, suivant plusieurs étapes, des CD sur sa structure (cf. Figure 27)²¹⁶, conférant des propriétés de complexation au PE+ qu'il est ensuite envisageable d'utiliser dans la formation d'assemblages par LbL.

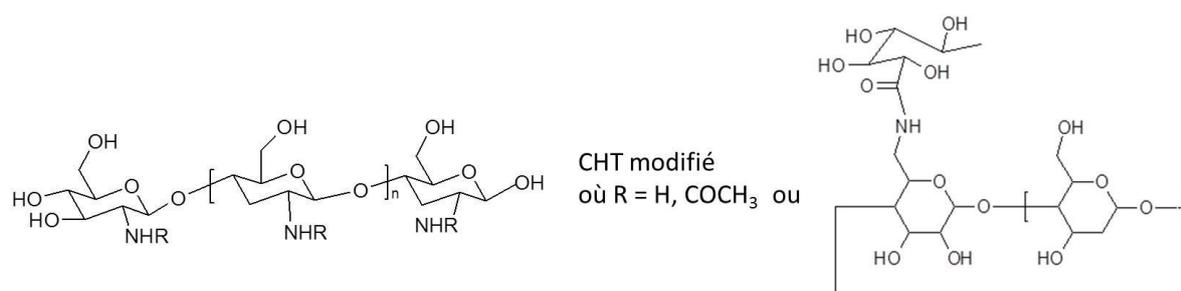


Figure 27 : Chitosan modifié à partir de β CD – les étapes de synthèse intermédiaires ne sont pas présentées²¹⁶

Daubiné *et al.* ont aussi utilisé cette technique de greffage pour la libération de médicaments en vue de prévenir la métastase osseuse¹⁷⁹. La poly(L-lysine) est chimiquement modifiée par greffage de β CD pour permettre la complexation de risedronate (utilisé couramment pour le traitement de l'ostéoporose) et ce nouveau PE est utilisé pour former les couches cationiques sur un substrat en verre. Les tests *in vitro* ont montré une bonne activité vis-à-vis des cellules.

L'équipe de Benkirane-Jessel a également complexé du Piroxicam dans un assemblage multicouches pour lui conférer des propriétés anti-inflammatoires¹⁷⁸. L'activité biologique était toujours présente après 12 heures, même si l'activité maximale a été enregistrée après quelques heures. Cela montre que la complexation du Piroxicam ne diminue pas ses propriétés et que sa libération permet d'obtenir les propriétés anti-inflammatoires désirées.

Pour les applications de thérapie génique, les cyclodextrines ont également été utilisées pour l'inclusion d'ADN dans des films multicouches. Ainsi, des assemblages ont été réalisés emprisonnant des cyclodextrines chargés et l'ADN, et montrant qu'en présence de CD, les propriétés de transfection de l'ADN étaient améliorées par rapport aux mêmes assemblages sans CD^{217, 218}.

II.3. Conclusion

Ainsi, les assemblages multicouches montrent un potentiel élevé pour les applications biomatériaux / dispositifs médicaux. Cette technique apparaît applicable sur une large variété de substrats, du verre au textile en passant par le métal, et possédant des géométries plus ou moins complexes. La construction de tels assemblages est dépendante de nombreux facteurs, plus ou moins faciles à contrôler, afin d'obtenir toutes les propriétés désirées. L'épaisseur des différentes couches, la rugosité, etc... dépendent du pH des solutions de PE, de la force ionique en solution ou encore de la température.

Le choix des PE utilisés est également un critère important à prendre en compte puisque ceux-ci sont très nombreux et peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Déjà, en vue d'applications médicales, ils ne doivent pas apporter de toxicité supplémentaire au support inerte ou biocompatible. Ensuite, selon le PE choisi, il est possible d'emprisonner des molécules actives dans ces assemblages pour les transformer en réservoirs de médicaments à capacité de libération prolongée. En couplant les principes actifs avec un PE, par greffage chimique par exemple, ou en utilisant un PE présentant des propriétés de complexation, comme c'est le cas dans les exemples à base de cyclodextrines, il est possible de transformer les films multicouches en de vrais dispositifs « actifs ».

A la lumière de toutes ces informations, ce projet a pour but d'utiliser les systèmes multicouches et leurs propriétés de libération de médicaments pour construire un système actif sur support textile à base de cyclodextrines. En effet, on a vu dans la première partie de ce chapitre bibliographique, que les traitements de surface restent un bon moyen de lutter contre les risques encourus lors de contact avec des dispositifs médicaux. La technique LbL apparaît alors prometteuse,

puisqu'elle est très simple à mettre en œuvre et qu'il est envisageable d'utiliser de tels systèmes pour la libération de différents médicaments directement au niveau des zones concernées.

La technique de « dip coating » est utilisée pour cette étude, le chitosan est choisi comme polycation et un polymère de cyclodextrines présentant une capacité de complexation est choisi comme polyanion, ce qui va permettre de charger le système en molécules actives.

Il s'agit de déterminer les conditions de construction de ces films, d'étudier la complexation avec les différentes molécules choisies ainsi que la stabilité des assemblages et la libération des molécules introduites. Par ailleurs, puisque nous visons des applications biomédicales, des études de cytocompatibilité et de microbiologie sont également menées afin de justifier de la faisabilité du projet.

L'originalité de ce projet réside dans l'utilisation d'un assemblage d'origine naturelle sur un support textile, avec utilisation des cyclodextrines. Il s'agit d'une évolution du concept de traitement de surface monocouche à base de CD déjà largement étudié au laboratoire UMET de Lille.

PARTIE II :

Produits, Matériels & Méthodes

La construction des systèmes multicouches s'effectue selon la méthode développée par Decher en 1993¹⁰². Elle nécessite l'adsorption alternée en solution de deux polyélectrolytes de charges opposées sur le support textile modifié chimiquement par « dip coating ».

Cette partie présente les produits utilisés ainsi que les différentes techniques de construction et de caractérisation de ces assemblages.

I. Polyélectrolytes utilisés

I.1. Le polyélectrolyte positif : le Chitosan

Le chitosan est un polymère issu de ressources naturelles, puisqu'il provient de la chitine présente dans les carapaces de crustacés. Il est également biocompatible et régulièrement utilisé pour des applications dans les biomatériaux grâce à ses activités antibactérienne et cicatrisante intrinsèques. Il est également régulièrement utilisé dans des assemblages multicouches en tant que polyélectrolyte cationique sur des surfaces solides^{130,189}. Sa représentation est donnée en Figure 28.

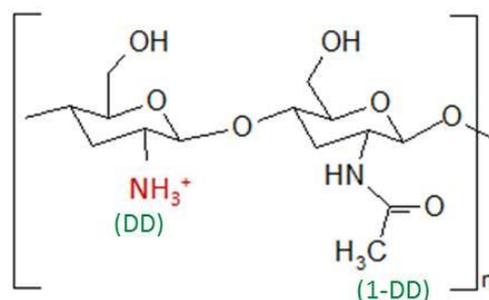


Figure 28 : Formule développée du chitosan dans sa forme acide

Le chitosan n'est soluble dans l'eau qu'en condition acide et sa viscosité dépend en grande partie de sa masse molaire et de sa concentration. La solubilisation des différents CHT se fera systématiquement dans l'acide acétique (AcOH) à 10 mL/L (J.T Baker), formant ainsi la solution de polyélectrolyte cationique.

Selon la société Sigma-Aldrich qui vend les deux chitosans utilisés dans cette étude – CHT de bas et de moyen poids moléculaires (CHT-B et CHT-M) - le degré de désacétylation (DD), c'est-à-dire le taux de groupements NH_3^+ potentiel, est compris dans une certaine fourchette, de même que leurs masses molaires déterminées par viscosimétrie capillaire.

Le DD est une donnée relativement importante dans notre étude, puisqu'il va permettre de connaître la densité de groupements amines du chitosan (cf. Figure 28) utilisé et, a fortiori, la densité de charges disponibles portées par les groupes NH_3^+ pour former des assemblages multicouches. Cette propriété du chitosan peut avoir une influence significative dans la construction et la dégradation des assemblages multicouches ; c'est pourquoi il est important de connaître une valeur précise. Afin de mieux caractériser ces produits, ces deux données sont déterminées expérimentalement.

La littérature présente plusieurs techniques pour déterminer le degré de désacétylation du chitosan telles que les spectroscopies (IR, RMN), la chromatographie, les dosages potentiométriques ou colorimétriques (ninhydrine) ou encore la spectrophotométrie UV^{219,220,221,222}. Afin de vérifier la concordance des résultats, des analyses IR et UV sont réalisées dans cette étude. Les deux protocoles détaillés de ces expérimentations sont donnés respectivement en ANNEXE 1 et ANNEXE 2

Par IR, les bandes d'absorbance à 1320 et 1420 cm^{-1} donnent un degré de désacétylation à 81 +/- 0,1 %. La technique de dosage par UV dans l'acide acétique donne un degré de désacétylation à 84,2 +/- 1,8 %. Les valeurs obtenues par les deux techniques sont concordantes. Une moyenne de ces deux valeurs donne un DD de 82,6%, c'est-à-dire 4,9 mmol de groupements NH_2 ionisables pour 1g de chitosan.

De même, les masses molaires des deux CHT ont été déterminées par viscosimétrie capillaire²²³ sur un appareil SCHOTT AVS 360 à température ambiante avec un capillaire de diamètre 53 mm. Une solution mère de chitosan, de concentration massique C_1 (10 g/L % pour CHT-B et 1 g/L pour CHT B) est préparée par solubilisation dans un solvant composé d'acide acétique et d'acétate de sodium (0,3 M et 0,2 M respectivement) et des dilutions successives sont réalisées. Pour chaque solution, 4 points de mesure du temps d'écoulement sont réalisés.

La relation de Mark-Houwink donne la masse viscosimétrique des polymères suivant l'équation :

$$M_v = \sqrt[\alpha]{\frac{[\eta]}{K}}$$

où α et K sont les paramètres prédéterminés par Rinaudo *et al.*²²³ pour des chitosans de degré d'acétylation de 21 % et dans les conditions opératoires précédemment décrites ($\alpha = 0,76$ et $K = 74.10^{-5}$ dL/g).

Les différents résultats obtenus comparés aux données fournisseurs sont donnés dans le Tableau 10 suivant.

Tableau 10: Données fournies par la société Sigma-Aldrich et résultats expérimentaux concernant les 2 CHT étudiés

		CHT-B	CHT-M
		CAS : 9012-76-4	CAS : 9012-76-4
Données	DD (%)	75 - 85	75 - 85
	Mv (g.mol ⁻¹)	59 200 < Mv < 65 000	260 000 < Mv < 262 000
Expérimental	DD (%)	82,6	82,6
	Mw (g.mol ⁻¹)	50 000 < Mv < 190 000	190 000 < Mv < 310 000

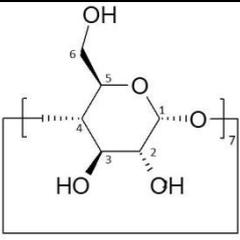
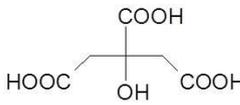
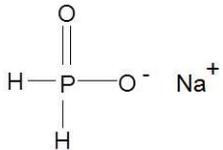
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/>

Le rapport est donc de 4 entre la masse viscosimétrique du chitosan de bas poids moléculaire et celle du chitosan de poids moléculaire moyen.

I.2. Le polyélectrolyte négatif : le PolyCTR-βCD

Le polyCTR-βCD est synthétisé à partir de la βCD native, d'acide citrique (CTR) et de l'hypophosphite de sodium (NaH₂PO₂.H₂O). Les principales caractéristiques de ces produits et leurs provenances sont données dans le Tableau 11.

Tableau 11: Caractéristiques des produits utilisés pour la synthèse du polyCTR- β CD

Produits	β CD CAS : 7585-39-9	CTR CAS : 5949-29-1	$\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ CAS : 10039-56-2
Formules			
Masse molaire ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$)	1135	192	88
Point de Fusion ($^{\circ}\text{C}$)	—	153-159	90
Solubilité (g/L à 20°C , H_2O)	18,5	592	Infinie
Provenance	Roquette (Lestrem, France)	Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich

Le polymère anionique et soluble de cyclodextrine est pré-synthétisé afin d'être utilisé comme polyélectrolyte anionique dans le système LbL. Il est synthétisé selon le savoir-faire du laboratoire en suivant un processus déjà établi et publié^{224,225}.

I.2.1. Synthèse

Une solution contenant tous les produits solubilisés (β CD, catalyseur NaH_2PO_4 et CTR en proportions massiques respectives 10/3/10 pour 100 mL d'eau, conformément aux études précédemment réalisées au laboratoire²²⁴) est concentrée à l'évaporateur rotatif. La polymérisation est ensuite permise par un traitement à haute température (140°C , bain d'huile) pendant 30 min sous pression réduite.

Le polymère soluble obtenu est ensuite solubilisé dans l'eau distillée puis filtré sur fritté (porosité 2) pour éliminer la part de polymère insoluble également synthétisée au cours du processus, et qui reste en suspension dans la solution. Cette part insoluble correspond à la fraction la plus réticulée du polymère ($M_n > 100\,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), et n'est pas utilisée dans cette étude.

La solution de polymère soluble est ensuite dialysée dans l'eau pendant 3 jours (membranes cellulose 6000 – 8000 Da) puis lyophilisée. En fin de processus, une poudre blanche et très soluble

dans l'eau est obtenue et utilisée pour la construction des multicouches dans le reste des études, formant la solution de polyelectrolyte anionique.

I.2.2. Caractérisation

La masse molaire de ce polymère a été caractérisée par chromatographie d'exclusion stérique ($M_w = 22\,560\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $M_n = 13\,040\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $M_w/M_n = 1,73$) et il se présente en solution sous forme de nano-objets dont le rayon hydrodynamique est de 175 nm. Sa structure est donnée en Figure 29.

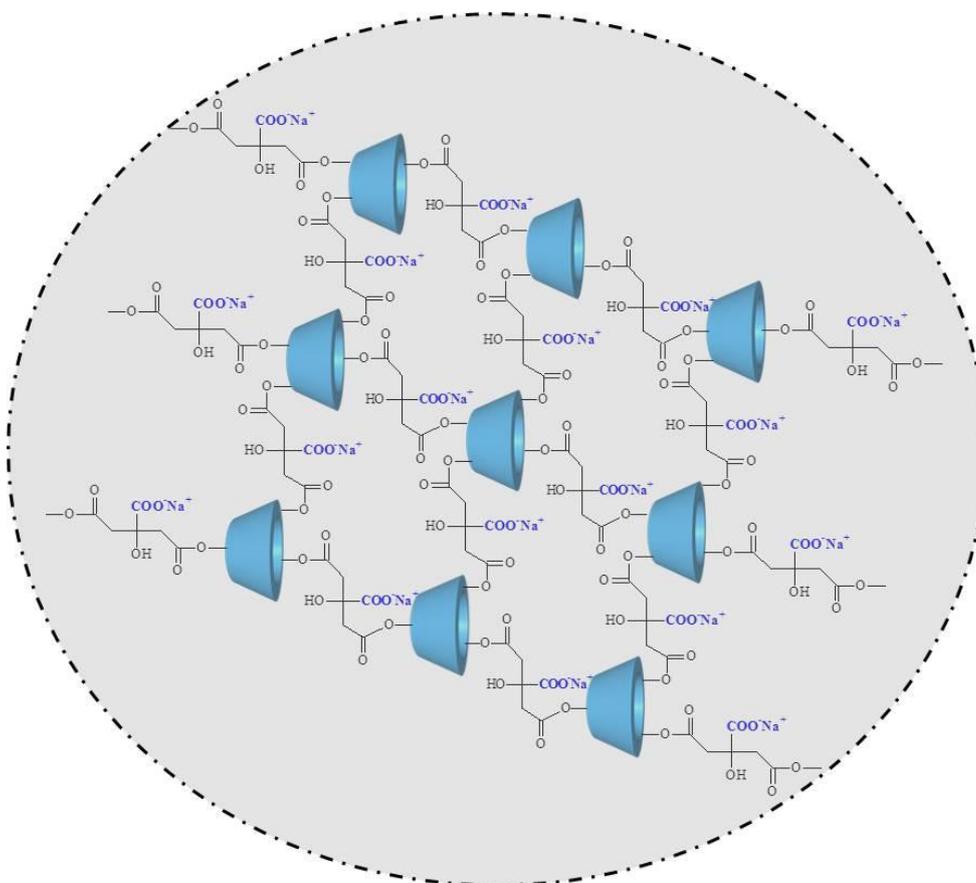


Figure 29 : Représentation schématique d'un agrégat de PolyCTR-βCD en solution sous sa forme basique

Le nombre de fonctions COOH disponibles a été déterminé grâce à un dosage acide/base suivi par pH-métrie. 100 mg de polymère est solubilisé dans l'eau et dosé par une solution de soude à 0,05 M. Ce dosage a montré la disponibilité de 4 mmol de fonctions COOH par gramme de polymère. Ainsi, les deux polymères CHT et PolyCTR-βCD ont des densités de charge relativement équivalentes en solution (4,9 et 4 mmol respectivement). Ce polymère de cyclodextrines a été largement étudié et caractérisé au laboratoire²²⁵.

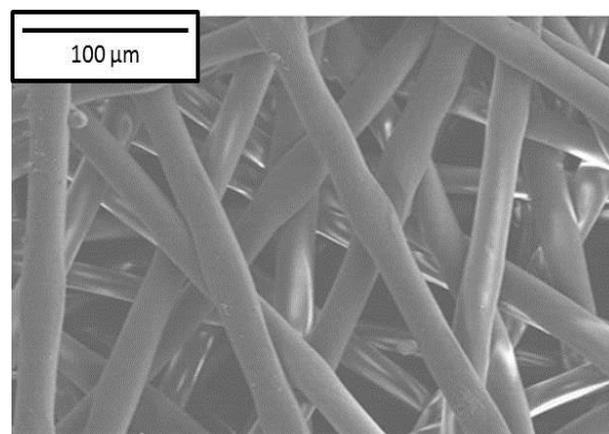
II. Le support textile

Un non-tissé fait de fibres de polyéthylène terephthalate (PET) a été sélectionné en se basant sur de nombreux critères. Son prix attractif, sa stabilité chimique ainsi que ses propriétés mécaniques et sa biocompatibilité en font un candidat régulièrement étudié^{104,139}, spécialement pour les implants vasculaires ou les sutures³⁵. Par ailleurs, ce textile résiste aux hautes températures (fusion à 245 °C) et a été largement étudié au laboratoire^{226,227}.

Le PET non tissé de référence NSN 365 est fourni par la société PGI-Nordlys (Bailleul, France). Ses propriétés sont regroupées dans le Tableau 12 suivant.

Tableau 12: Caractéristiques du PET utilisé et image MEB (x 250)

Caractéristiques	PET NSN 365
Type de Liage	Thermolié
Grammage	65 g/m ²
Finesse	0,24 mm
Résistance à la rupture	210 N/5cm
Elongation à la rupture	25 %
Porosité	2400 L/m ² /s
Température de Fusion	250°C-265°C
Taille des pores	65 µm (en moyenne)



II.1. Création de groupes carboxylates

Le PET étant chimiquement inerte et non ionique (à part les fonctions COOH en bout de chaînes très peu abondantes en surface des fibres), pour permettre les futures interactions ioniques entre le support et la couche ionique suivante, il est important d'apporter des charges en surface. Pour rendre le support anionique, deux techniques sont utilisées.

Afin d'éliminer les impuretés d'ensimage, les échantillons textiles sont systématiquement lavés par soxhlet (500 mL) avant utilisation, avec de l'isopropanol dans un premier temps, puis avec de l'eau distillée (2 h et 3 h 30 respectivement, ce qui correspond à chaque fois à 3 cycles de soxhlet). Les échantillons sont ensuite séchés pendant 1 h à 90 °C.

II.1.1. Par hydrolyse

L'hydrolyse basique du PET permet l'hydrolyse partielle des fonctions ester à la surface des fibres pour former des groupements carboxylate anioniques en surface.

Deux voies sont utilisées pour réaliser cette hydrolyse. La première est une technique peu agressive, élaborée à partir de la littérature²²⁸, tandis que la seconde est une technique plus agressive obtenue par traitement à reflux. Ces méthodes seront respectivement appelées H1 et H2.

- **Technique H1** : Les échantillons de PET sont pesés, puis immergés pendant un temps t donné dans une solution de soude ($[\text{NaOH}] = 2,5 \text{ M}$) à $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Au temps t , les échantillons sont retirés de la solution puis lavés à l'eau distillée jusqu'à atteindre un pH neutre. Enfin, ils sont séchés puis pesés afin de déterminer l'influence du traitement sur la perte de masse.
- **Technique H2** : Les échantillons sont pesés, puis immergés pendant un temps donné dans une solution de soude ($[\text{NaOH}] = 1 \text{ M}$) à reflux. Au temps t , le reflux est stoppé, et de même que pour la technique H1, les échantillons sont lavés à l'eau distillée. S'en suivent les étapes de séchage et de pesée.

II.1.2. Par thermofixation

En second lieu, un traitement de surface appliquant une technique développée et brevetée au laboratoire (Figure 30) est utilisée^{85,86,229}. Nous avons tiré parti de travaux antérieurs, notamment une thèse réalisée au laboratoire²³⁰, qui permettent de transformer le PET en textile échangeur d'ions par la thermofixation d'un mélange d'acide citrique et de cyclodextrines, conduisant à la formation « in situ » d'un enrobage des fibres^{88,231}.

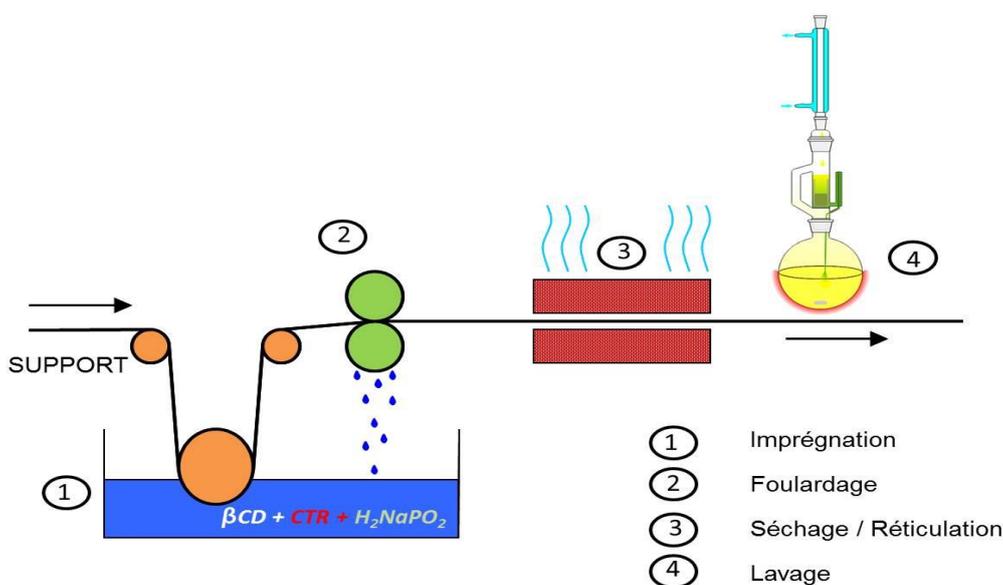


Figure 30 : Schématisation du processus de thermofixation pour former la 1^{ère} couche

Le processus de thermofixation est utilisé afin d'apporter des charges surfaciques par enrobage des fibres textiles et fixation stable d'un polymère anionique sur celles-ci. Il s'agit du dépôt d'une première couche par interactions physiques sur le support.

Les échantillons de PET vierge lavés (10x5 cm) sont imprégnés dans la solution contenant la β -cyclodextrine, le catalyseur et l'acide citrique dans les proportions massiques 10/3/10 dans 100 mL d'eau distillée ; puis sont passés au foulard textile (cf. Figure 31) afin d'éliminer les excédents de solution (répété 3 fois). Après une étape de séchage à 90°C pendant 5 min, la réaction de thermofixation est réalisée pendant un temps fixé dans une rame textile à température choisie constante.



Figure 31 : Foulard et rames de finition textile utilisés pour la fonctionnalisation du PET

Les résidus non-polymérisés sont éliminés par un lavage final au soxhlet, à l'eau distillée, pendant 3 h 30 puis séchés à 90 °C.

Le gain de masse de cette étape (GM, en %) représente le taux de greffage de la réaction et est calculé selon l'équation ci-dessous :

$$GM (\%) = \frac{M_f - M_i}{M_i} \times 100$$

où M_i et M_f correspondent respectivement à la masse de l'échantillon avant et après le traitement de thermofixation, mesurées avec une balance de précision ($\pm 4.10^{-5}$ g). Avant les pesées, les échantillons sont systématiquement séchés à 90 °C pendant 30 min.

Ce processus permet la fonctionnalisation du textile PET grâce à la formation du polymère polyCTR- β CD par la réaction de polyestérification entre les cyclodextrines et l'acide citrique. Il a été montré que cet enrobage adhérait à la fibre uniquement par interactions physiques (cf. Figure 32), et résistait relativement bien aux milieux aqueux. Des essais (non publiés) ont montré une résistance de

l'enrobage sur 2 à 3 mois en conditions in vitro et in vivo sur une prothèse vasculaire²³², qui serait compatible avec les procédés de dépôt LbL, notamment le dip-coating. .

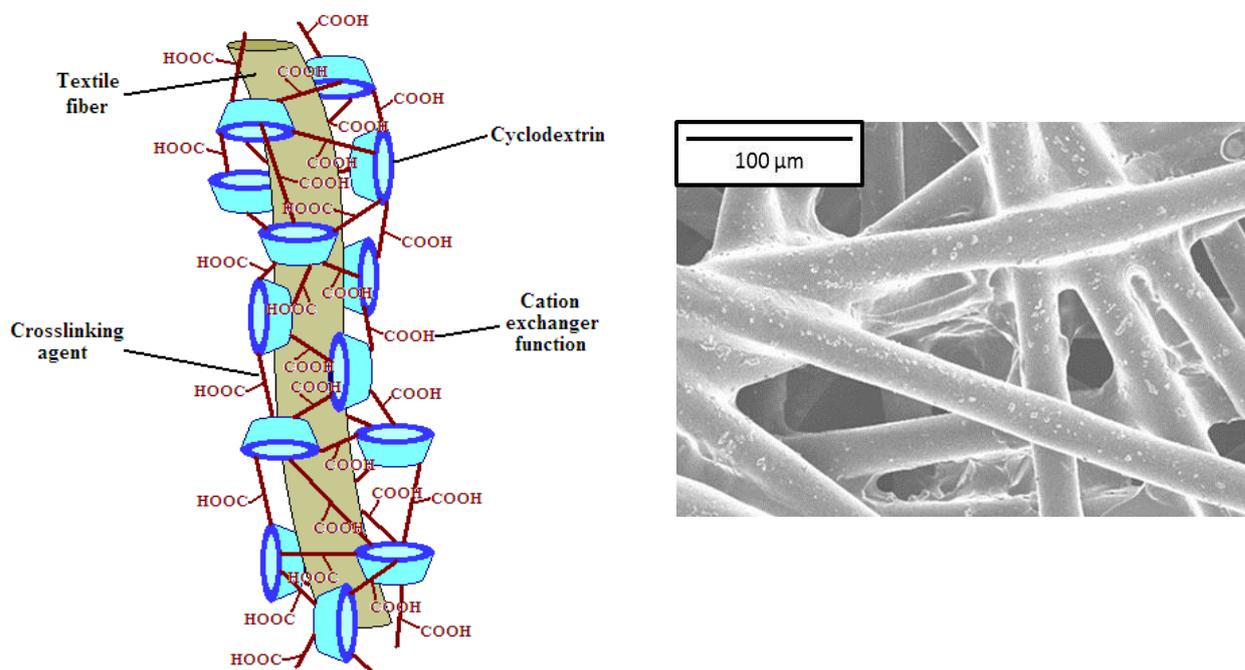


Figure 32 : Schématisation d'une fibre de PET enrobée par le polyCTR-βCD et image MEB (x400) du PET après le processus de thermofixation

Les fonctions carboxylates sont ensuite générées par un traitement au carbonate de sodium (0,1 M), pendant 10 min d'agitation suivie de rinçages à l'eau distillée jusqu'à obtenir un pH neutre. La présence de ces groupements en surface offre de nouvelles propriétés d'échange d'ions au support textile. **Cette première couche est numérotée comme la couche n°1.**

II.2. Dosage des groupes carboxylates

Afin de comparer les deux techniques présentées ci-avant et de déterminer la plus efficace en matière d'apport de charges surfaciques, il s'agit de doser les fonctions ioniques disponibles en surface.

La Capacité d'Echange Ionique (CEI) des échantillons thermofixés est déterminée en utilisant la méthode de l'acétate de calcium décrite dans le Journal United States Pharmacopoeia (USP 1995). La CEI correspond au nombre de groupements fonctionnels par unité de masse de textile (mmol/g).

On place, sous agitation, une masse connue (0,5 à 1 g) d'échantillon dans 50 mL d'une solution d'acétate de calcium (2 % massique) pendant 1 h. Cette étape permet un échange de

protons entre les groupements carboxyliques (Acide citrique) présents sur le textile et les ions calciums afin de former de l'acide acétique AcOH (Figure 33).

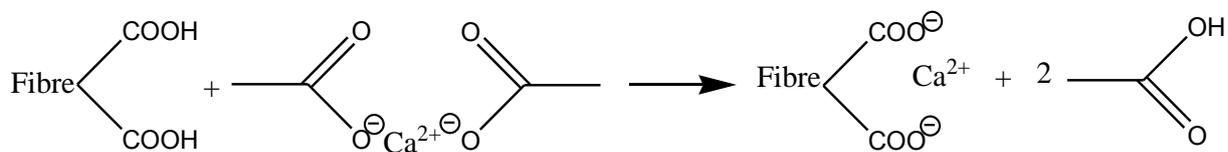


Figure 33: Echange de protons lors du dosage CEI

La solution est ensuite filtrée, puis dosée par une solution de soude à 0,05 mol/L en utilisant la phénophtaléine comme indicateur coloré.

Le taux de fonctions carboxyliques est calculé en suivant l'équation suivante:

$$\text{CEI (mmol/g)} = \frac{C_b (\text{mmol/L}) * V_e (\text{L})}{x (\text{g})}$$

où C_b et V_e correspondent respectivement à la concentration en NaOH de la solution titrante et au volume équivalent déterminé et x à la masse d'échantillon introduit.

Le dosage CEI est utilisé lorsque les taux de charges sont relativement importants car la technique n'est vraisemblablement pas assez sensible pour détecter de faibles taux tels que ceux apportés par les fonctions carboxyliques en bout de chaînes sur le PET vierge.

III. Construction des assemblages multicouches

III.1. La spectroscopie optique par guide d'onde (OWLS)

L'OWLS (pour Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy) est une méthode qui permet d'étudier et de suivre « en direct » les interactions entre des molécules ou des macromolécules et des surfaces de manière quantitative²³³⁻²³⁵, via les phénomènes d'adsorption, de liaison ou d'adhésion²³⁶⁻²³⁹.

La technique OWLS, décrite en détail en 1989 par Tiefenthaler *et al.*²⁴⁰, utilise les propriétés de réflexion de la lumière à l'interface guide d'onde / couche adsorbée pour déterminer l'indice de réfraction de cette couche et ainsi remonter à son épaisseur ainsi qu'à la quantité de molécules adsorbées par unité de surface (cf. Figure 34). Le principe de base de la méthode OWLS est qu'une lumière polarisée linéairement (laser He-Ne) est couplée à la lumière évanescente par un réseau de diffraction au sein d'un guide d'onde si la condition de couplage est remplie. Le couplage est un phénomène de résonance qui se passe à deux angles d'incidence bien définis (mode électrique et magnétique) lesquels dépendent de la valeur de l'indice de réfraction du milieu couvrant la surface du guide d'onde.

Plus précisément, un faisceau laser (He-Ne) polarisé linéairement passe à travers un obturateur, est réfléchi par un prisme, puis arrive avec un certain angle incident à la surface du capteur. Ce dernier est basé sur un réseau optique fin préparé sur un guide d'onde, également fin, situé sur un substrat en verre positionné sur un rotateur dont l'angle de rotation est contrôlé continuellement (par paliers) par un moteur durant la mesure. Grâce à son indice de réfraction élevé (n_f de l'ordre de 1,75 à 1,82), le guide d'onde permet la propagation de la lumière uniquement par réflexion interne totale. Selon la quantité et la polarisabilité des macromolécules adsorbées, la lumière est réfléchie avec un certain déphasage et l'intensité lumineuse à la fois en mode électromagnétique (TE) et magnétique (TM) atteint un maximum pour certains angles (angles de couplage) entre la source laser et la cellule qui sont mesurés par l'appareil. La lumière couplée est détectée de manière continue aux extrémités du capteur par des photodiodes (cf. Figure 34).

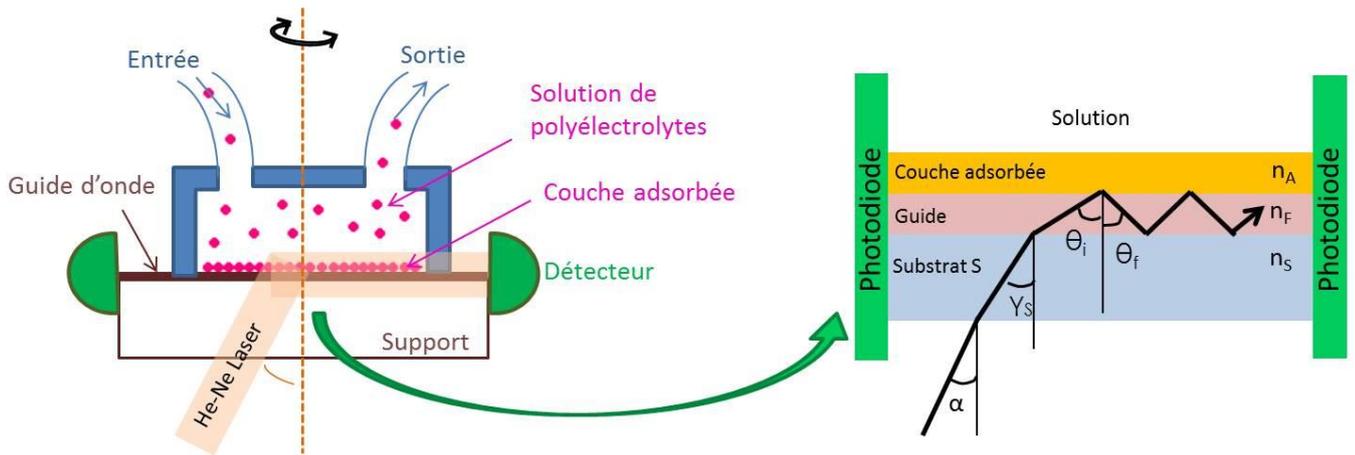


Figure 34: Schématisation d'une cellule d'OWLS et principe de mesure

Les variations des angles de couplage vont dépendre de l'indice de réfraction et de l'épaisseur de la couche adsorbée^{241,242-244}. L'indice de réfraction n_A d'une macromolécule dépend linéairement de sa concentration (c_A) selon l'équation (1) :

$$n_A = n_C + c_A * \frac{dn}{dc} \quad (1)$$

où n_C est l'indice de réfraction du solvant et où le coefficient dn/dc dépend de la polarisabilité des molécules mais possède une valeur quasiment universelle pour toutes les protéines ($0,182 \text{ cm}^3/\text{g}$)²⁴⁵. En accord avec la convention de Gibbs, pour $c_A \gg c_C$ (c_C = concentration du solvant dans la couche adsorbée), la quantité de molécules adsorbées par unité de surface M peut s'exprimer en fonction de l'épaisseur de la couche adsorbée (d_A) selon l'équation (2)²⁴⁶.

$$M = c_A * d_A \quad (2)$$

En combinant les deux équations (1) et (2), on obtient l'équation (3) qui donne la quantité de molécules adsorbées par unité de surface.

$$M = d_A * \frac{(n_A - n_C)}{dn/dc} \quad (3)$$

La technique OWLS est généralement utilisée pour le suivi de la construction d'assemblages multicouches^{126, 196, 201, 247, 248}. Elle présente des avantages par rapport à la technique SPR (pour Surface Plasmon Resonance), notamment la mesure directe de l'indice de réfraction et des deux angles de couplage ainsi que la possibilité de travailler avec des substrats différents sous réserve

qu'ils soient transparents. Tout comme la technique SPR, OWLS est une technique très sensible (~ 1 ng/cm²).

Les mesures OWLS ont été réalisées à l'Institut des Biomolécules Max Mousseron à Montpellier (UMR CNRS 5247). L'appareil est un OWLS 120 composé d'une sous-unité SIS06 pour les injections d'échantillons et d'une pompe seringue NE-1000 (Microvacuum Ltd., Budapest, Hongrie). La source de lumière est un laser He-Ne linéairement polarisé qui émet à 632,8 nm. La température du porte-échantillon est gardée constante grâce à un dispositif Pelletier TC dirigé par un contrôleur Omron. Toutes les mesures et calculs ont été réalisés avec le logiciel Biosense 2.6. Le guide d'onde a pour dimensions 12 mm x 2 mm et présente une périodicité de 2400 lignes/mm. Il est composé de $\text{Si}_x\text{Ti}_{(1-x)}\text{O}_2$, où $x = 0,25 \pm 0,05$ avec une épaisseur (d) de 170 nm.

Avant chaque mesure, la surface de la cellule est nettoyée sous sonication par contact avec une solution aqueuse acide (4N HCl/H₂SO₄) pendant 15 min puis rincée successivement avec de l'eau distillée et de l'acétone. Toutes les expérimentations ont été réalisées sous flux continu à 50 mm³/min jusqu'à l'obtention d'un plateau. Le CHT solubilisé dans l'acide acétique est injecté en premier dans la cellule, puis un rinçage par une solution de NaH₂PO₄ à pH = 4,8 est effectué afin d'éliminer les molécules non adsorbées à la surface de la cellule. Lorsqu'un nouveau plateau est atteint, le polyCTR- β CD est injecté à son tour, suivi par la même étape de rinçage. Ces opérations sont répétées autant de fois que nécessaire en fonction du nombre de couches désiré à la surface.

III.2. Protocole de construction des multicouches sur textile

La construction des assemblages multicouches a été réalisée selon la technique Layer-by-Layer par « dip coating » représentée en Figure 35.

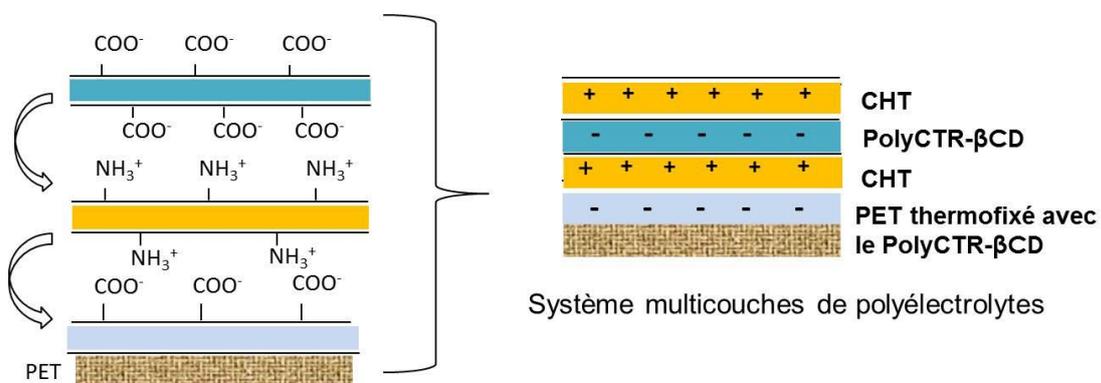


Figure 35 : Schématisation des interactions mises en jeu par la technique Layer-by-Layer sur le PET utilisant le polyCTR- β CD et le CHT comme polyélectrolytes

Les échantillons textiles pré-traités par thermofixation sont utilisés après activation des fonctions carboxylate par la solution de carbonate de sodium. Les adsorptions et rinçages successifs attenants à la technique du dip-coating représentés dans la Figure 36, sont réalisés à température ambiante sous agitation (150 tr/min). Les valeurs des concentrations données ici sont le résultat d'une optimisation de la technique sur les trois premières couches. Le procédé décrit en détail ci-dessous, sera nommé VOIE A.

L'abondante littérature sur les assemblages multicouches montre que les interactions ioniques mises en jeu dans de telles constructions sont extrêmement rapides pouvant aller de quelques secondes à quelques minutes^{106,107,131}, c'est pourquoi 15 min d'adsorption sont généralement préconisées. L'expérience a pu montrer que dans notre cas, les interactions étaient relativement rapides. Cependant, par souci de reproductibilité les 15 min de trempage sont effectivement utilisées.

La question du séchage des couches à chaque étape s'est également rapidement posée. Bien qu'il n'affecte pas la construction des assemblages multicouches, il semblerait que le séchage intermédiaire confère de meilleures propriétés aux assemblages en termes de qualité et de stabilité^{139,140}. Ainsi, le séchage intermédiaire apparaît comme un bon moyen d'obtenir des assemblages durables dans le temps, ce critère étant essentiel au vu des applications visées de cette étude. L'expérience a montré qu'à 90°C, les échantillons sont secs après 15 min dans l'étuve.

Ces conditions – 15 min d'adsorption et 15 min de séchage entre chaque étape – sont appliquées pour tout le reste de l'étude comme décrit ci-dessous.

Premièrement, les échantillons textiles pré-traités par thermofixation (cf. II.1.2) sont plongés 15 min dans 50 mL d'une solution de chitosan (5 g/L) solubilisé dans l'acide acétique (10 mL/L), puis séchés à 90°C pendant 15 min. L'étape suivante, qui consiste à plonger les échantillons dans une solution d'acide acétique à 3 mL/L pendant 15 min suivi d'un séchage à 90 °C (15 min), constitue l'étape de rinçage et permet d'éliminer l'excès de chitosan déposé. Afin de former la troisième couche anionique, le support est ensuite plongé (15 min) dans une solution de polyCTR- β CD à 4 g/L solubilisé dans l'eau distillée, puis séché à 90 °C durant 15 min. De même que précédemment, une étape de rinçage (15 min dans H₂O distillée puis séchage à 90 °C pendant 15 min) est nécessaire pour éliminer l'excédent de polymère. Les couches suivantes sont formées en répétant ces opérations jusqu'à ce que le nombre désiré soit atteint (cf. Figure 36). Cette voie de construction est schématisée par la VOIE A dans le schéma récapitulatif des différentes constructions (cf. Figure 41) donné plus loin.

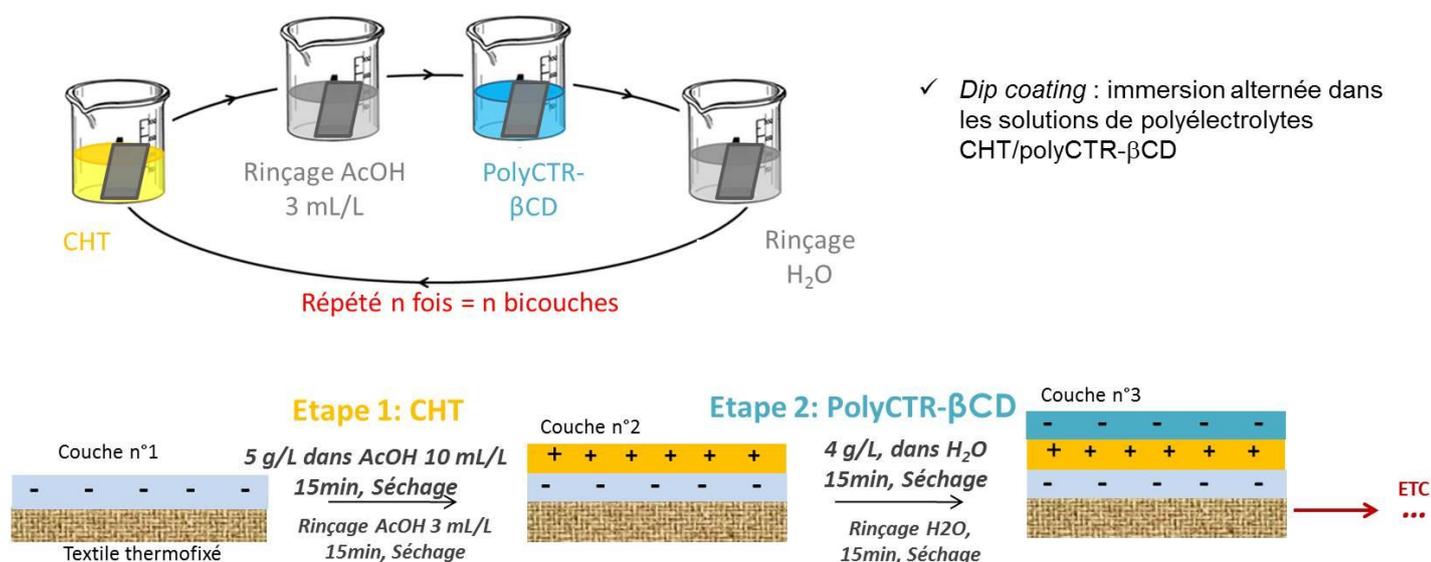


Figure 36 : Représentation schématique du protocole de construction des assemblages multicouches aux conditions optimisées (VOIE A)

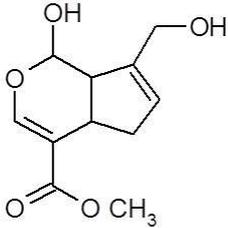
Dans ce cas, une bicouche est considérée comme l'association d'une couche de polyCTR-βCD suivie d'une couche de CHT. **La seconde couche de CHT est numérotée comme la couche n°2, et la couche suivante de polyCTR-βCD est labellisée comme la couche n°3 etc...** De ce fait, les couches de CHT sont représentées par les couches paires et celles de polyCTR-βCD par les couches impaires.

III.3. Stabilisation des multicouches

III.3.1. Réticulation chimique par la génipine

Comme présenté dans la partie bibliographique, la stabilité des assemblages peut être augmentée par réticulation des couches entre elles. Ici, nous avons choisi d'utiliser la réticulation du chitosan par la génipine. Cette dernière est un agent réticulant naturel, issu du fruit du gardénia, qui réagit avec les fonctions amine¹⁵⁵. La réticulation entre le CHT et la génipine se fait par liaisons covalentes C-N, suivant deux mécanismes possibles^{156,157} déjà présentés dans la Partie I (II.1.4.b)), et la couleur bleue apparaît au moment de la formation de ces liaisons. Ses principales caractéristiques sont regroupées dans le Tableau 13.

Tableau 13: Caractéristiques principales de la g n p ine

Formule CAS : 6902-77-8		
Masse molaire (g.mol⁻¹)	226	
Point de fusion (�C)	120 - 121	
Toxicité LD₅₀ sur des rats (mg/kg)	intraveineuse	153
	oral	237
Fournisseur	Sigma-Aldrich	

Ici, des solutions aqueuses de g n p ine de concentrations variables sont étudiées pour la réticulation : 0 ; 0,01 ; 0,05 ; 0,1 % (w/v). La dissolution de la g n p ine dans l'eau distillée est permise par passage aux ultrasons pendant 15 min. Les échantillons textiles ayant subi le traitement de dip-coating (2x2 cm) sont placés dans une boîte multipuits (taille X6) et mis en contact avec 2 mL de solution de g n p ine. Puis, pour permettre une réticulation efficace, la boîte multipuits est placée sous agitation (100 tr/min)   37  C pendant 24 h. Après ce temps, les échantillons sont successivement séchés à 37  C pendant 24 h, et à 90  C pendant 15 min, puis rincés 15 min dans l'eau distillée et séchés à 90  C. La nomenclature des échantillons est représentée comme suit : nombre de couches – concentration en g n p ine. Par exemple, 10C G0,01% correspond à un assemblage à 10 couches réticulées avec la solution de g n p ine de concentration 0,01 % (w/v).

III.3.2. Dépôt d'une couche terminale de PLGA

Une autre technique de stabilisation utilise un polymère dégradable comme dernière couche de l'assemblage. Le poly(acide lactique co-glycolic) (PLGA) est déposé en dernier sur les textiles ayant subi le traitement de dip coating (3x3 cm). Ce polymère est en effet régulièrement utilisé en raison de sa bonne biocompatibilité et de la possibilité de contrôler sa d gradation²⁴⁹.

Une solution de PLGA solubilisé dans le dichlorométhane (20 g/L) est préparée. Les échantillons multicouches sont trempés dans cette solution et exprimés par foulard textile (3 fois). Enfin, ils sont mis à sécher pendant 24 h à 50  C pour éliminer le dichlorométhane résiduel et permettre de former la dernière couche.

IV. Caractérisation des assemblages multicouches sur textile

La caractérisation des assemblages multicouches a été réalisée à l'aide de différentes techniques complémentaires.

IV.1. Méthode gravimétrique

Le gain de masse (GM) après chaque étape est déterminé suivant l'équation suivante :

$$GM (\%) = \frac{M_i - M_n}{M_i} * 100$$

où M_i et M_n sont respectivement le poids de l'échantillon de PET Vierge de départ et le poids de l'échantillon après traitement (thermofixation ou construction multicouches par LbL). Les échantillons sont pesés sur une balance de précision (10^{-5} g) après séchage 30 min à 90 °C.

IV.2. Microscopies

Les différents échantillons sont observés par microscopie optique (Olympus BX41) et par microscopie électronique à balayage (MEB). Les images MEB ont été obtenues avec un microscope Hitachi S-4700 SEM FEG (Field Emission Gun) opérant avec un voltage de 5 kV. Les échantillons sont préalablement recouverts d'une couche de carbone conductrice.

IV.3. Analyses ThermoGravimétriques (ATG)

Les analyses thermogravimétriques ont été conduites sur un appareil TGA Q50 (TA Instruments). Les échantillons ont été placés dans des creusets en platine, mis sous atmosphère gazeuse (azote), et une rampe de 5 °C/min a été appliquée pour toutes les expériences (balance : 10 mL/min, four : 90 mL/min).

IV.4. Spectroscopie Infrarouge

Un spectromètre Perkin Elmer (Spectrum One) équipé du logiciel Spectrum a été utilisé pour conduire les analyses. Les spectres ATR (en Réflexion Total Atténuée) ont été collectés par 16 scans sur une échelle de nombres d'onde allant de 400 à 4000 cm^{-1} avec une résolution de 4 cm^{-1} . Les

spectres en transmission des poudres du chitosan et du polyCTR- β CD ont été obtenus à partir des pastilles de bromure de potassium (1 % dans le KBr).

IV.5. Zétamétrie

Le potentiel zéta correspond à la différence de potentiel entre une surface et un flux d'électrolytes parallèle à celle-ci. Il permet ainsi de déterminer les charges surfaciques d'échantillons textiles et dans notre cas plus particulier, de visualiser l'alternance des charges en fonction des couches déposées en surface. Dans les faits, il s'agit d'appliquer un flux d'une solution d'électrolytes dans une cellule contenant l'échantillon textile puis de mesurer la différence de potentiel aux extrémités de la cellule en fonction de la différence de pression qui leur est appliquée, comme présenté en Figure 37.

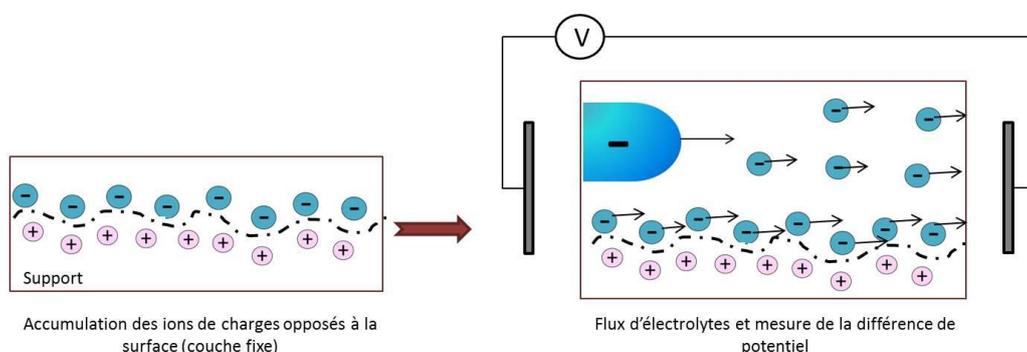


Figure 37 : Principe de la mesure du potentiel zéta par zétamétrie

Tous les échantillons sont plongés dans une solution saline (KCl à 10^{-3} M) dont le pH est ensuite ajusté à la valeur désirée en utilisant des solutions acides ou basiques (HCl ou KOH à 0,1 M) pendant 24 h pour permettre la stabilisation. Les mesures sont réalisées en triplicata pour obtenir une valeur moyenne.

Le potentiel zéta a été déterminé à l'aide d'un appareil Zetacad de l'École Nationale Supérieure des Arts et Industries Textiles (ENSAIT) de Roubaix présenté en Figure 38.



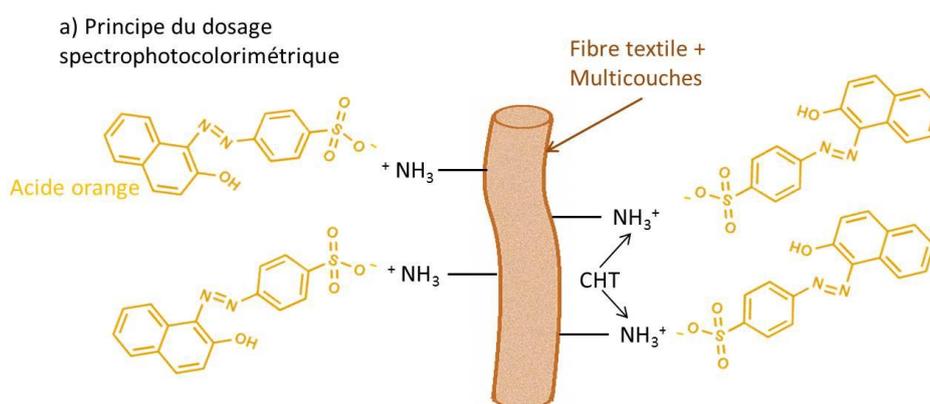
Figure 38 : Zétamètre de l'ENSAIT

IV.6. Dosage des fonctions amines du CHT

Le dosage colorimétrique par l'acide orange (AO) est utilisé afin de déterminer la quantité de groupements amine issus du chitosan, présents et disponibles en surface. Une représentation schématique de ce dosage est donnée en Figure 39. a).

Une solution aqueuse d'acide orange est préparée ($2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$) et son pH est ajusté à 3 en ajoutant une solution d'HCl à 0,5 M. Chaque échantillon est trempé dans 10 mL de cette solution, sous agitation (60 tr/min) à 25 °C afin d'adsorber l'acide orange. Après une nuit, chaque échantillon est lavé trois fois pendant 5 min, sous agitation, dans une solution d'eau acidifiée (pH = 3). La désorption est effectuée par immersion des échantillons dans 10 mL d'une solution aqueuse à pH = 12, pendant une nuit à 25 °C et sous agitation. Puis, le pH de la solution est ajusté à pH = 3 en ajoutant 1 mL de solution d'HCl à 0,1 M. L'absorbance à 485 nm est finalement mesurée.

Une courbe de calibration est préalablement réalisée en utilisant le même traitement à l'acide orange sur des échantillons de PET vierge, sur lesquels une quantité définie de chitosan a été déposée puis séchée (Figure 39.b)).



b) Courbe d'étalonnage

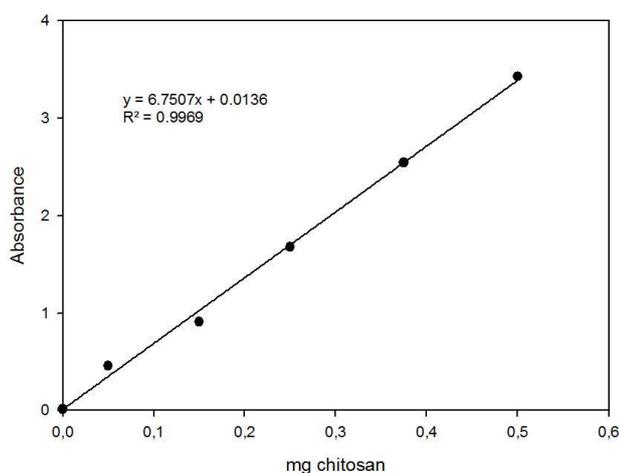


Figure 39: a) Schématisation de principe de dosage à l'acide orange b) Courbe d'étalonnage du chitosan par dosage à l'acide orange ($[\text{AO}] = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$)

V. Dégradation des assemblages multicouches

V.1. En milieux aqueux

Les systèmes multicouches sont soumis à une étude de dégradation en batch en solution dans trois milieux différents : milieu alcalin (PBS, pH = 7,4), milieu neutre (eau distillée, pH = 7) et milieu acide (acide acétique à 0,3 % v/v, pH = 3). Les échantillons sont individuellement placés dans 10 mL de solution sous agitation (100 rpm) sur un banc oscillant thermostaté à 37 °C (Thermoshake, Gerhardt, Les Essarts-le-Roi, France). Au temps choisi, ils sont sortis du système, séchés (1 h, 90 °C) et pesés afin de suivre l'évolution de masse au cours du temps (les échantillons dans le PBS subissent une étape de rinçage à l'eau pendant 1 min pour éliminer le sel déposé). Chaque milieu est renouvelé par 10 mL de solution fraîche et les échantillons sont remis en solution jusqu'à la prochaine pesée. Les résultats donnés sont la moyenne de 6 réplicas. Afin d'évaluer la masse perdue et de pouvoir simultanément comparer la construction et la dégradation des assemblages, la perte de masse (PM en %) est calculée en prenant la masse du textile vierge de départ en référence selon l'équation ci-dessous.

$$PM (\%) = \frac{M_f - M_i}{M_i} * 100$$

où M_i est la masse du PET vierge qui n'a subi aucun traitement et M_f est la masse de l'échantillon mis en dégradation aux différents temps choisis.

V.2. En milieu physiologique

Afin de tester les échantillons dans des conditions similaires à celles s'ils étaient implantés dans le corps, une étude de dégradation en milieu physiologique a été réalisée au sein de l'Unité U1008 : « Médicaments et biomatériaux à libération prolongée : Mécanismes et optimisation » de l'Université de Lille 2. Le milieu utilisé est le Milieu Essentiel Minimum (MEM) d'Eagle (Gibco BRL) comprenant 50 µg/mL de gentamicine (Panpharma) et 10 % de sérum de veau nouveau-né (SVNN).

Des pastilles de 15 mm de diamètre sont prélevées dans les échantillons multicouches puis pesées et placées dans des plaques multipuits de 24 puits. Afin de stériliser les pastilles, les puits sont remplis avec 1 mL d'éthanol, mis sous agitation pendant 1 min, puis l'éthanol est retiré et les plaques sont mises à sécher ouvertes à température ambiante pendant 30 min dans un premier temps, puis fermées pendant une nuit à 37 °C dans un second temps.

Ensuite, 1,5 mL de MEM est ajouté par puits et les plaques sont laissées sous agitation (80 tr/min) à 37 °C pendant les temps définis (1 h, 4 h, 7 h, 24 h, 48 h, 72 h). Après le temps d'incubation souhaité, les échantillons sont transférés dans une nouvelle boîte multipuits, et chaque face des pastilles est rincée avec deux fois 2 mL d'eau MiliQ. Un traitement par la trypsine (500 µL/puits à 37 °C pendant 10 min) est réalisé pour éliminer les dernières traces de sérum. A nouveau, chaque face des pastilles est rincée avec deux fois 2 mL d'eau MiliQ. S'en suit un séchage à 90 °C pendant 15 min et finalement les échantillons sont pesés pour déterminer les taux de dégradation.

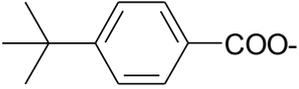
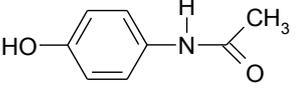
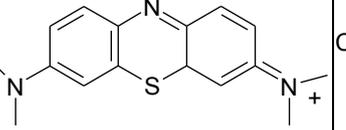
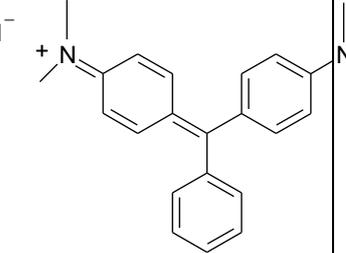
VI. Complexation de principes actifs modèles dans les assemblages

VI.1. Principes actifs modèles (PAM) étudiés

En ce qui concerne les principes actifs modèles (PAM) étudiés pour encapsulation dans ce projet, l'Acide 4-Tert-Butyl Benzoïque (TBBA), le Paracétamol (P), le Bleu de Méthylène (BM) et le Vert de Malachite (VM) sont tous des produits commerciaux de la société Aldrich Chemicals. Ils ont été sélectionnés car ils sont connus pour former des complexes hôtes/invités 1:1 avec la β CD native. De plus, leurs pKa, pour ceux qui possèdent des groupements chargés, sont compatibles avec les pH des solutions de travail pour la formation des multicouches, à savoir neutre et acide. Et finalement, ils sont facilement détectables et quantifiables par spectrophotométrie UV-Vis. Pour ces raisons, les complexes entre les β CD, ou certains de leurs dérivés et le TBBA^{216, 250, 251}, le paracétamol (P)^{252,253}, le BM²⁵⁴⁻²⁵⁶, et le VM²⁵⁷ ont largement été étudiés.

Leurs principales caractéristiques sont regroupées dans le Tableau 14 suivant :

Tableau 14: Principales caractéristiques des principes actifs modèles étudiés

Molécule	Formule	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Charge	Solubilité (g/L, H ₂ O 20°C) ²⁵⁸
Acide 4-tert-butyl benzoïque (TBBA)		178,2	Anionique	0,05 (pH = 4,4)
Paracétamol (P)		151,2	Neutre	14 (pH = 6,4)
Bleu de méthylène (BM)		319,9	Cationique	50 (pH = 7,5)
Vert de malachite (VM)		364,9	Cationique	1 (pH = 7,4)

VI.2. Etude de la complexation des PAM avec le polyCTR- β CD

VI.2.1. RMN

La résonance magnétique nucléaire du proton a été utilisée afin de mettre en évidence la complexation des PAM dans les cavités des β -cyclodextrines.

Tous les spectres RMN liquide du proton ^1H ainsi que les séquences NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) des différents polymères et mélanges ont été réalisés dans l'eau deutérée (D_2O) sur un appareil High Resolution 400 MHz Bruker AdvanceTM 400 au Centre Commun de Mesures RMN de l'Université de Lille 1.

Les spectres du proton permettent de visualiser le déplacement chimique des protons dû à la différence d'environnement causée par l'inclusion des PAM dans les cavités. La carte 2D obtenue grâce à la séquence NOESY permet de visualiser directement les protons qui sont proches dans l'espace et ainsi de détecter les interactions dipolaires entre les protons des cyclodextrines et ceux des molécules invitées. Il s'agit, dans le cas du polyCTR- β CD, d'observer les déplacements des protons H_3 et H_5 de la cyclodextrine qui prouvent l'inclusion (cf. Figure 40).

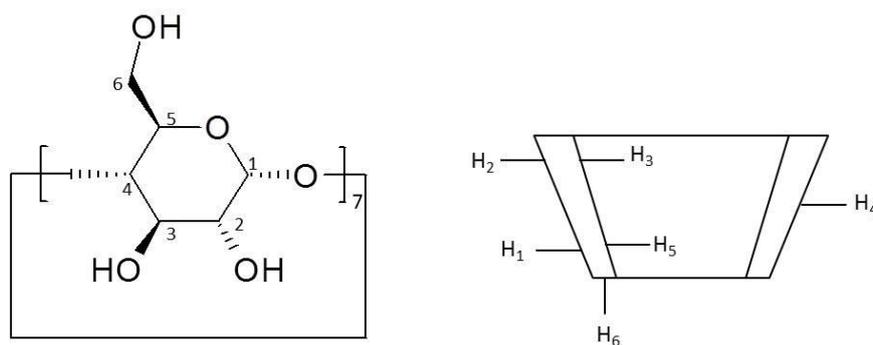


Figure 40 : Position des protons internes et externes de la β CD

VI.2.2. UV-Visible

La constante d'association K_a reflète l'interaction entre les deux espèces moléculaires mises en jeu. Elle permet de déterminer la stabilité d'un complexe en solution, ce qui peut donner une première information sur les profils de libération des différents PAM. Tous les PAM étudiés dans ce projet présentent des groupements aromatiques chromophores. Par conséquent, aux longueurs d'onde correspondantes, la complexation entre les PAM et les CD s'accompagne d'une modification du spectre UV-visible, c'est-à-dire une augmentation ou une diminution de l'absorbance (effets hyperchromes et hypochromes) ou des longueurs d'onde (effets bathochromes et hypsochromes).

Cette constante est déterminée en utilisant l'équation de Benesi-Hildebrandt, qui est valable dans le cas de complexes 1:1 entre les molécules hôtes et invitées dans des conditions telles que la cyclodextrine soit en large excès par rapport à la molécule invitée²⁵⁹.

Il s'agit donc de préparer différents mélanges de PAM/polyCTR- β CD dans lesquels la concentration en principe actif modèle est gardée faible et constante (0,01 mM) tout en variant la concentration en β CD de 1 mM à 10 mM (variant le ratio molaire β CD/PAM de 100 à 1000). L'absorbance de ces solutions est mesurée aux longueurs d'onde adaptées à la molécule modèle après 24 h (Shimadzu UV – 1800 Spectrometer).

L'équation de Benesi-Hildebrandt suivante, permet ensuite de remonter à la constante d'association K_a en traçant la droite $[\beta\text{-CD}]_0 / \Delta A_{obs} = f([\beta\text{-CD}]_0)$ car l'ordonnée à l'origine

correspond à $\frac{1}{K_a \cdot \Delta A_{max}}$.

$$\frac{[\beta - \text{CD}]_0}{\Delta A_{obs}} = \frac{[\beta - \text{CD}]_0}{\Delta A_{max}} + \frac{1}{K_a \cdot \Delta A_{max}}$$

où ΔA_{obs} est la variation de déplacement chimique des protons aromatiques dans le mélange et ΔA_{max} la variation de déplacement chimique des protons aromatiques dans le complexe pur.

VI.3. Différentes méthodes du chargement du système par les PAM

Un schéma récapitulatif des différentes voies de construction avec et sans PAM est donné en Figure 41. Les différents procédés expérimentaux sont ensuite explicités ci-après.

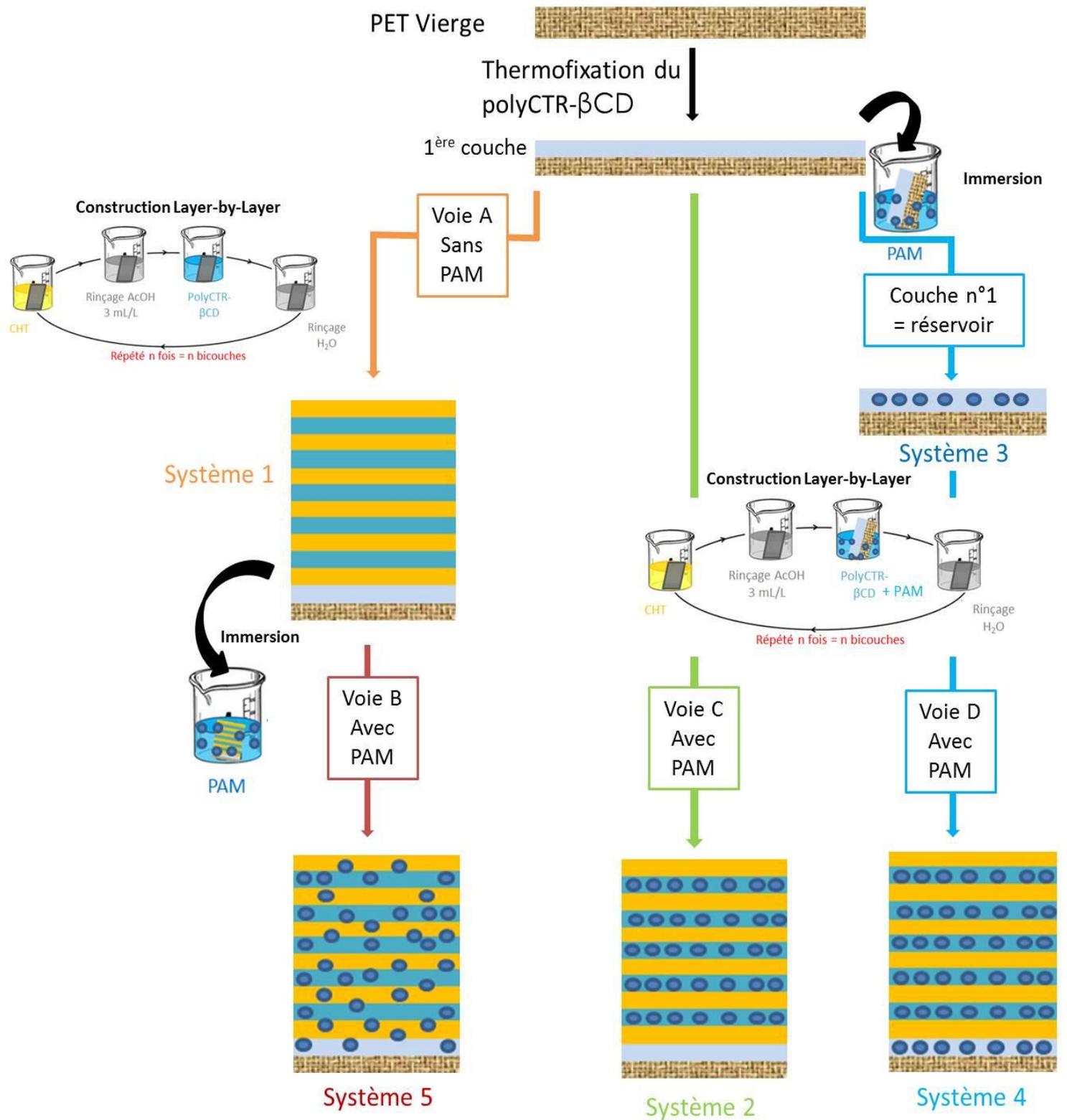


Figure 41 : Schéma récapitulatif des différentes voies de construction des assemblages avec et sans complexation des PAM

VI.3.1. Chargement du PAM par diffusion à travers l'assemblage – Voie B

Dans ce cas, le processus décrit en Figure 36 ci-avant est utilisé pour construire un assemblage multicouche vide ($n = 12$). Ensuite, l'échantillon est plongé pendant 4h dans la solution aqueuse de PAM (à concentration stœchiométrique C pour le Paracétamol et le BM, et à C_{\max} pour le TBBA) puis rincé 5 min dans l'eau distillée deux fois et enfin, séché à 90 °C. Cette voie de construction est représentée par la Voie 4 sur le schéma récapitulatif (cf. Figure 41) et forme les systèmes 5.

VI.3.2. Complexation du PAM dans le polyélectrolyte anionique – Voie C

Le processus de construction décrit précédemment (cf. Figure 36, Voie A) est utilisé pour construire les assemblages incluant la molécule modèle. Dans ce cas, le seul changement provient du fait que la solution anionique n'est plus uniquement constituée de polyCTR- β CD mais du complexe PAM /polyCTR- β CD et que le temps d'imprégnation dans cette solution est augmenté (30 min au lieu de 15 min). Le complexe est préalablement formé en solution par mélange des quantités définies en polyCTR- β CD et en molécule modèle dans l'eau distillée, sous agitation pendant 24 h. Cette voie de construction est représentée par la Voie C sur le schéma récapitulatif (cf. Figure 41) et forme les systèmes 2.

Une fois encore, le ratio PAM / polyCD utilisé est le ratio stœchiométrique 1:1 pour avoir une molécule de PAM par cavité de CD présente ; lorsque l'étude est pertinente les ratios 4:1, 2:1, 1:2 et 1:4 sont également testés. Le cas du TBBA est un peu différent. Dû à sa faible solubilité dans l'eau ($C_{\max} = 50$ mg/L), un seul ratio (correspondant au maximum de solubilité) a été testé et le ratio molaire TBBA /polyCD n'était plus de 1:1 mais de 1:6.

VI.3.1. Imprégnation de la 1^{ère} couche thermofixée – Voie D

Il est possible, puisqu'elle présente un haut taux de CD, d'utiliser la première couche thermofixée comme réservoir de molécules. Pour ce faire, l'échantillon thermofixé est plongé pendant 4 h dans la solution aqueuse de PAM puis rincé deux fois 5 min dans l'eau distillée et enfin, séché à 90 °C pendant 30 min. La concentration C utilisée est la concentration stœchiométrique calculée pour chaque principe actif modèle, pour qu'en solution, le nombre de molécules soit équivalent au nombre de CD disponibles, conduisant à un ratio molaire PAM/polyCD de 1:1 (0,44 mmol de β CD pour 1 g de polymère car 50/50 CTR/ β CD). On forme alors les systèmes 3.

Après cette première étape, l'assemblage multicouche est construit sur le système 3, en suivant le même protocole que pour la Voie C. On obtient un système construit selon la Voie D (cf. Figure 41)

VI.4. Cinétiques de libération

Pour la libération, les milieux testés sont les suivants : milieu alcalin (PBS, pH = 7,4), milieu neutre (eau distillée, pH = 7) et milieu acide (acide acétique à 3 g/L, pH = 3).

Les échantillons textiles (3x3 cm, 100 mg en moyenne) chargés en PAM sont individuellement placés dans 20 mL de solution sous agitation (100 rpm) à 37 °C. Après un temps déterminé, 2 mL de cette solution sont prélevés puis transférés dans des cellules de quartz (1 cm). Les quantités de principes actifs libérés en solution sont déterminées par UV-Visible (Shimadzu UV – 1800 Spectrometer) à la longueur d'onde désirée après avoir réalisé une courbe de calibration pour chaque PAM.

Les coefficients d'extinction spécifiques des différents principes actifs modèles dans les différents milieux sont donnés dans le Tableau 15.

Tableau 15: Coefficients d'extinction spécifiques des différents PAM étudiés dans les différents milieux

Molécule	Longueur d'onde (nm)	Coefficients d'extinctions spécifiques (L.mg ⁻¹ .cm ⁻¹)		
		H ₂ O	AcOH 3 g/L	PBS
Paracétamol	275	0,061	xxxx	xxxx
TBBA	240	0,0702	xxxx	xxxx
Bleu de méthylène	290	0,1263	xxxx	0,0863
	664	0,1989	0,2957	0,2164
Vert de Malachite	423	0,03	xxxx	0,0241
	617	0,1675	xxxx	0,1124

VII. Cytocompatibilité

Ces tests sont réalisés au sein de l'Unité U1008 : « Médicaments et biomatériaux à libération prolongée : Mécanismes et optimisation » de l'Université de Lille 2.

VII.1. Vitalité cellulaire

Il s'agit de mesurer la vitalité cellulaire par dosage colorimétrique en utilisant le Bleu Alamar qui est un indicateur de croissance fluorescent basé sur la détection de l'activité métabolique cellulaire^{260,261}. Le changement de couleur ne peut intervenir que dans le cas de cellules vivantes et son intensité est proportionnelle à l'activité cellulaire.

Pour cette étude, des cellules épithéliales pulmonaires embryonnaires humaines L132 en culture sont utilisées (ATCC CCL-5). Les cellules sont cultivées dans le Milieu Essentiel Minimum de Eagle (Gibco BRL) comprenant 50 µg/mL de gentamicine (Panpharma), 250 µg/mL de fungizone (Gibco BRL) et 5 % de sérum de veau fœtal (SVF, Eurobio). L'utilisation de ces cellules est justifiée par leur sensibilité à la cytotoxicité et la reproductibilité.

Après neutralisation des fonctions acide par traitement au carbonate de sodium (0,1 M, 15 min puis rinçages) des pastilles de 11 mm de diamètre sont découpées à l'emporte-pièce dans les échantillons multicouches.

Les cellules sont cultivées dans des plaques de 24 puits sur les pastilles de 11 mm de diamètre, pendant 3 et 6 jours sans changement de milieu. Le réactif est ajouté directement dans les puits après culture et la fluorescence à 560 nm est mesurée avec un fluoromètre Twinkle LB970™ (Berthold).

Le taux de vitalité relatif est exprimé en pourcentage par rapport à la culture témoin. Les tests sont réalisés en triplicata et le témoin utilisé est le TCPS (Tissue Culture PolyStyrene).

VII.2. Prolifération cellulaire

Ce test est réalisé afin d'évaluer la cytocompatibilité d'un support grâce à la croissance cellulaire *in vitro*. Les mêmes cellules L132 que précédemment sont utilisées pour cette étude. 48 h avant le test, les cellules destinées à la manipulation sontensemencées dans des boîtes de culture afin qu'elles se trouvent dans une phase de croissance exponentielle de prolifération au moment de leur utilisation. Le milieu de culture est un milieu MEM de Eagle (Eurobio) auquel est ajouté 5 % (v/v) de sérum de veau (Eurobio) et contient 0,1 g/l de streptomycine et 100 µg/L de pénicilline comme antibiotiques.

Des pastilles de 11 mm de diamètre sont déposées dans une boîte de culture multipuits. Les cellules sontensemencées sur ces échantillons à la densité de 10 000 cellules/puits. Après 3 et 6 jours d'incubation, les cellules sont détachées des échantillons avec 0,3 mL de trypsine (0,1 % p/v) dans la solution Hank's sans Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺. Pour parfaire le détachement des cellules, celles-ci sont rincées à l'aide de 7,7 mL d'une solution de NaCl à 0,9 %. La suspension de 8 mL ainsi obtenue est bien homogénéisée à l'aide d'une pipette Pasteur. La suspension cellulaire est ensuite comptée à trois reprises à l'aide d'un compteur cellulaire Coulter Z1 (Coultronics).

Le taux de prolifération relatif est exprimé en pourcentage de la culture témoin.

VIII. Etude microbiologique (avec le BM)

Les essais d'évaluation microbiologique ont été réalisés au sein du laboratoire de bactériologie de l'Université de Lille 2. La bactérie utilisée pour l'évaluation microbiologique est le *Staphylococcus epidermidis* (05001).

VIII.1. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Dans un premier temps, il s'agit de déterminer la CMI du BM envers les bactéries pour justifier de son activité. La souche bactérienne est préalablement repiquée sur une gélose inclinée Mueller Hinton Agar (MHA) dans un tube incubé 24h à 37°C. Les colonies sont ensuite décrochées et remises en suspension dans un milieu Ringer Cystéiné (RC) et, la solution est diluée afin d'avoir une concentration plus faible, de l'ordre de 10^4 . Avant de réaliser les tests microbiologiques, les échantillons multicouches sont stérilisés par passage aux UV (15 min).

Dans chaque puits d'une ligne d'une plaque de 24 puits (1 plaque par souche bactérienne), on introduit 100 μ L de milieu RC puis est ajouté 100 μ L d'une solution de BM (1 g/L) uniquement dans le premier puits. On prélève 100 μ L de la solution de BM + RC de ce premier puits, que l'on dépose dans le second puits, puis 100 μ L de solution du second puits que l'on dépose dans le troisième puits, etc... Par ces dilutions successives, on obtient une gamme de concentrations variables en BM avec 100 μ L de solution dans chacun des puits, en veillant à enlever les 100 μ L de surplus dans le dernier puits. On ajoute ensuite 100 μ L de la suspension bactérienne dans chaque puits. Les témoins positifs (T+) correspondent à 100 μ L de RC + 100 μ L de suspension bactérienne et les témoins négatifs (T-) correspondent à 200 μ L de milieu RC.

Les plaques sont finalement incubées à 37°C, pendant 24h et 48h. La CMI est définie comme la plus basse concentration à laquelle il n'y a pas de croissance visible, ce qui se traduit par la concentration du premier puits ne présentant pas le trouble en solution, caractéristique de la croissance bactérienne, et qui correspond à une concentration de $0,016 \cdot 10^{-2}$ g/L en BM contre la bactérie *Staphylococcus epidermidis* (05001).

VIII.2. Test de Kirby-Bauer

L'étude bactériologique permet de vérifier l'activité antibactérienne des échantillons au cours du temps, qui diminue au fur et à mesure de la libération du PAM piégé. Ces essais

microbiologiques sont basés sur la technique de Kirby-Bauer^{96,262} dont une représentation schématique est donnée en Figure 42.

Les échantillons sont testés sous forme de pastilles de 11 mm de diamètre découpées à l'emporte-pièce et en triplicata. Afin d'obtenir une étude comparative, les témoins sont composés des échantillons de PET vierge et de PET thermofixé introduits pendant 4 h dans une solution de BM à 1 g/L puis rincés à l'eau miliQ. Les échantillons multicouches sont construits avec la technique de pré-encapsulation du BM dans le polyCTR- β CD.

Les échantillons sont stérilisés par UV, 15 min sur chaque face. Puis, ils sont introduits dans une plaque multipuits de 24 puits contenant 1 mL de PBS stérilisé pour permettre la libération. Après 1 h, tous les puits sont vidés puis les pastilles correspondantes au temps 1 h sont mises de côté et le milieu est renouvelé dans les autres puits. La même procédure est répétée pour tous les temps étudiés : 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h et 96 h.

Les géloses Mueller Hinton Agar (MHA) utilisées pour le test sont obtenues en coulant, dans des boîtes de Petri, 18 mL de la solution d'agar préalablement chauffée. Afin d'obtenir un tapis bactérien, une suspension bactérienne de concentration 10^4 de *Staphylococcus epidermidis* (05001) est préparée. Après ensemencement des bactéries sur les géloses (0,1 mL de suspension par boîte de Petri), les échantillons sont ensuite déposés sur la culture bactérienne (1 à 3 pastilles par gélose). Après 24 h d'incubation à 37 °C, l'activité antibactérienne se traduit par l'apparition d'un halo d'inhibition autour de la pastille. Il correspond à la partie où le BM a migré et a inhibé la croissance des bactéries. Le rayon du halo d'inhibition dans chacun des cas est présenté en fonction du temps de libération.

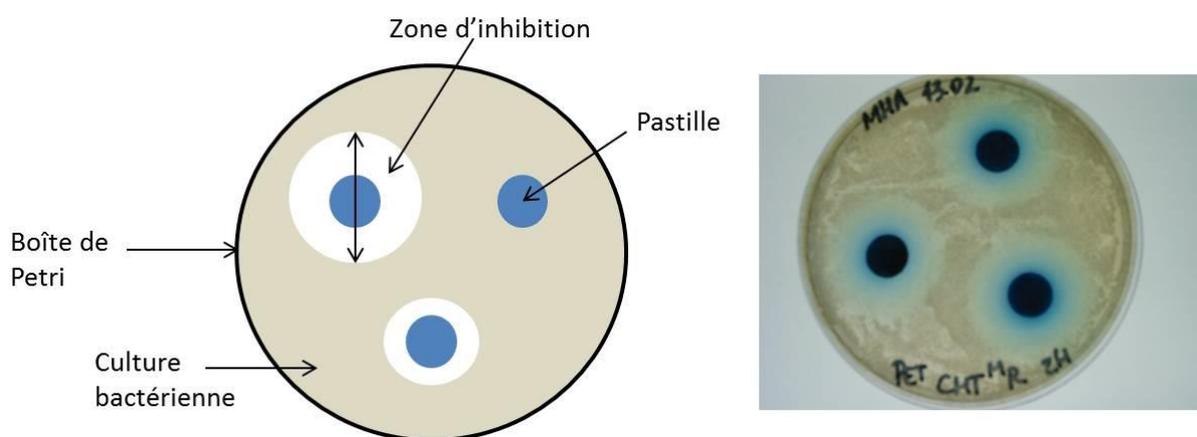


Figure 42 : Représentation schématique du test de Kirby-Bauer

PARTIE III :

Résultats & Discussion

I. Pré-traitement du support

Il est nécessaire de modifier le support de manière à lui apporter une densité de charge suffisante sur sa surface afin que la première couche de PE puisse être immobilisée sur le support via des interactions ioniques. La première solution consiste en une hydrolyse partielle des fonctions esters du PET pour former des groupements carboxylates (protocole H1 et H2) tandis que la seconde solution utilise la fonctionnalisation du textile par thermofixation d'un polymère anionique.

Le taux de fonctions carboxylates COO^- est ensuite déterminé. Une optimisation est réalisée pour chaque technique : pour l'hydrolyse, il s'agit d'obtenir le taux de COO^- le plus élevée en dégradant l'échantillon au minimum, alors que pour la technique de thermofixation, il s'agit d'optimiser les conditions opératoires conduisant à un enrobage des fibres pas un polymère réticulé à base de cyclodextrine et d'acide citrique.

I.1. Hydrolyse partielle du PET

Sous conditions basiques, le PET peut s'hydrolyser partiellement en suivant le schéma réactionnel donné en Figure 43.

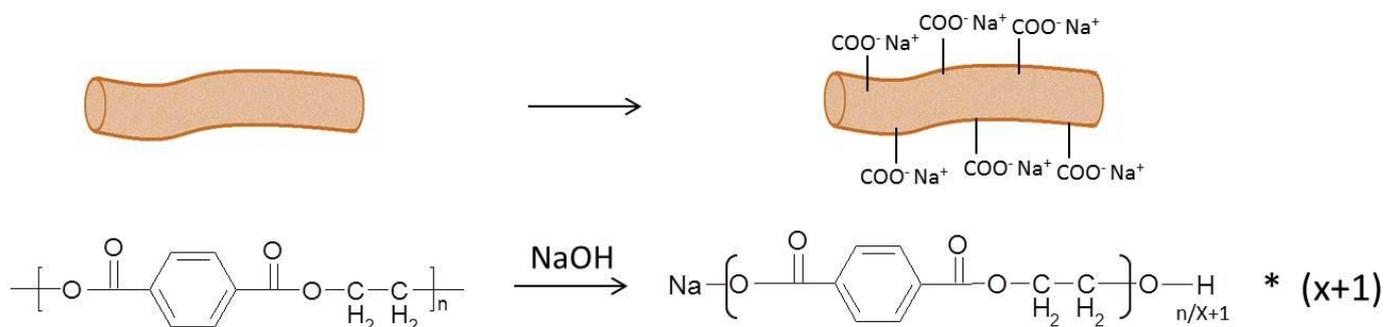


Figure 43: Schéma réactionnel de l'hydrolyse partielle du PET par la soude

Deux protocoles d'hydrolyse par la soude du PET, H1 et H2 (avec et sans reflux, cf. PARTIE II, II.1.1), ont été testés à différents temps de réaction afin de conférer au support un caractère anionique tout en le dégradant au minimum. Le Tableau 16 suivant présente, à la fois, les pertes de masses subies par les supports suite à ces traitements d'hydrolyse, ainsi que leurs capacités d'échange ionique déterminées par la méthode de l'acétate de calcium.

Tableau 16: Moyenne des pertes de masse et des CEI des échantillons après les traitements d'hydrolyse (H1 : 50°C, H2 : reflux)

Protocoles	H1		H2	
Temps de réaction	Perte de masse (%)	CEI ($\mu\text{mol/g}$)	Perte de masse (%)	CEI ($\mu\text{mol/g}$)
5min	0,26	0	3,61	45
30 min	0,85	0	17,87	71
1h	2,08	0	39,59	30
4h	38,7	—	—	—
8h	38,1	—	—	—

Par hydrolyse, les oligomères formés peuvent se décrocher du support et on constate une perte de poids plus ou moins importante selon la technique utilisée (H1 ou H2) et le temps de contact. Le protocole H1 est une méthode douce qui ne permet pas d'obtenir un taux de charges détectable par la méthode de l'acétate de calcium et après 4h, l'échantillon est partiellement détruit. Le protocole H2 permet de mesurer une CEI comprise entre 30 et 71 $\mu\text{g/mol}$ selon l'échantillon, mais ce protocole est très fragilisant et conduit très vite à des pertes de masses élevées (à partir de 30 min), ce qui induit une perte rapide des propriétés mécaniques.

I.2. Fonctionnalisation par thermofixation du PET

En ce qui concerne la voie de thermofixation sur textile (cf. PARTIE II, I.2), il a déjà été montré que le temps et la température influaient largement sur le gain de masse représentatif de la fixation du polymère polyCTR- β CD qui enrobe les fibres, et donc sur la quantité de fonctions carboxylates⁸⁷. La Figure 44 montre l'évolution parallèle du gain de masse (GM) et de la capacité d'échange ionique (CEI) des échantillons en fonctions du temps et de la température de fonctionnalisation. Le gain de masse est attribué à l'enrobage des fibres par la réaction de réticulation *in situ* entre les cyclodextrines et l'acide citrique⁸⁶. La CEI est exprimée en mmol de fonctions carboxylates par gramme de support disponibles par cette fixation. Une valeur maximale conduit à une forte densité de charge anionique en surface, permettant les interactions avec le PE+, et la poursuite de la construction du dépôt multicouches régi par les interactions ioniques entre PE+ et PE-.

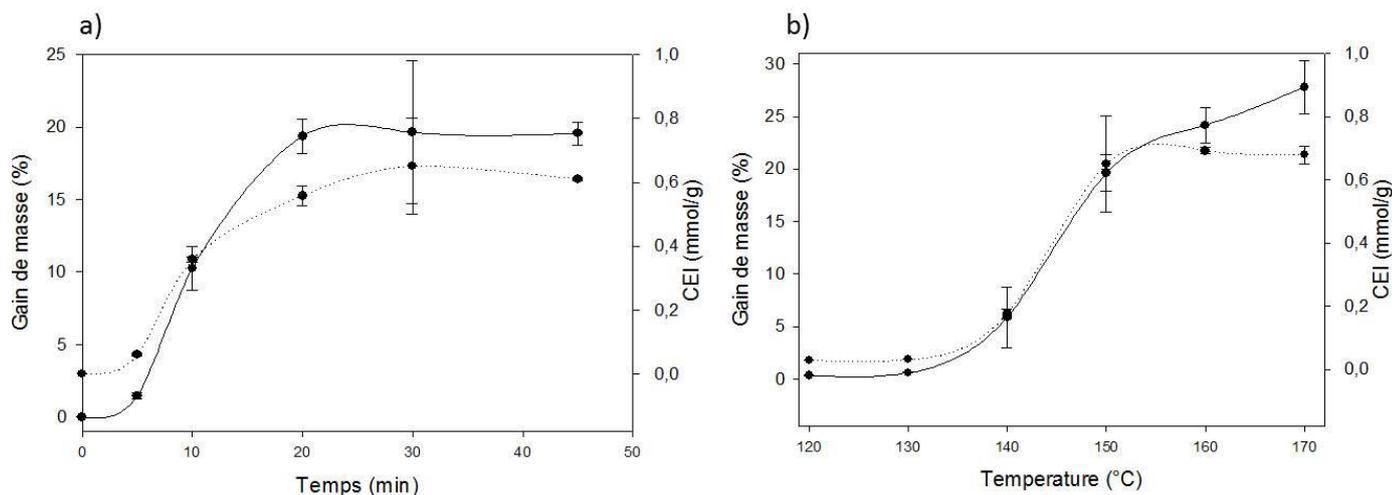


Figure 44 : Influence des paramètres de fonctionnalisation sur le gain de masse (—) et la CEI (...) du PET ; (a) en fonction du temps avec la température fixée à 150°C, (b) en fonction de la température avec le temps fixé à 30min

Comme montré sur la Figure 44.a), la CEI et le GM présentent une valeur limite après 30 minutes de réticulation à 150°C : 19,6 %-wt et 0,7 mmol/g de textile respectivement. La Figure 44.b) quant à elle montre qu'à temps fixe et température variable, la CEI se stabilise à partir de 150 °C même si le gain de masse augmente encore. Ce phénomène a déjà été relaté dans une étude précédente, et est attribué à l'estérification des groupements carboxyliques résiduels⁸⁶. Ainsi, une température de 150°C et un temps de réticulation de 30 min apparaissent comme les paramètres optimaux pour ce prétraitement de surface.

Cette couche anionique sur le support textile sera considérée comme la couche n°1. La couche suivante de chitosan sera numérotée comme la couche n°2, puis la couche suivante de polyCTR-βCD sera la couche n°3 et ainsi de suite... Ainsi, les couches paires correspondent aux couches de CHT et les couches impaires correspondent aux couches de polyCTR-βCD. La notation n =x, correspond au nombre de couche en surface du textile.

Dans toute la suite du manuscrit, l'appellation PET Thermofixé désignera le PET Thermofixé aux conditions optimales, soit à 150°C pendant 30 min présentant un gain de masse de 19,6 % et un taux de fonctions carboxylates de 0,7 mmol/g de textile.

II. Construction des films multicouches de CHT et de polyCD

II.1. Suivi de l'assemblage par OWLS

La construction des assemblages multicouches à partir des deux polyélectrolytes est suivie *in situ* par OWLS ce qui permet, avant l'étape sur textile, de justifier de la faisabilité de tels systèmes. Les concentrations en PE utilisées dans cette partie ([CHT-B] = 5 g/L, [polyCTR- β CD] = 6 g/L) ne sont pas encore considérées comme optimisées.

II.1.1. Suivi de l'auto-assemblage

Les couches de chitosan (CHT-B, dans AcOH 1%) et de polyCTR- β CD sont alternativement déposées à la surface de la cellule d'OWLS afin de construire le nombre de couches désiré en surface.

Pour une meilleure lisibilité des profils d'OWLS, l'évolution du gain de masse sur un assemblage à 6 couches est présentée (cf. Figure 45). Chaque étape d'injection de PE est suivie d'une étape de rinçage.

Comme attendu, l'injection des solutions de PE provoque une élévation instantanée du signal qui révèle un dépôt à la surface de la cellule, jusqu'à l'obtention d'un palier. L'étape de rinçage permet ensuite d'éliminer les molécules non adsorbées à la surface. Un nouveau plateau est atteint et l'injection suivante peut alors être effectuée. Les plateaux successifs et l'évolution régulière du profil de la masse de molécules adsorbées par unité de surface révèlent la superposition des couches. La quantité de PE déposée est exprimée en ng/cm^2 et l'épaisseur de la couche adsorbée est exprimée en nm.

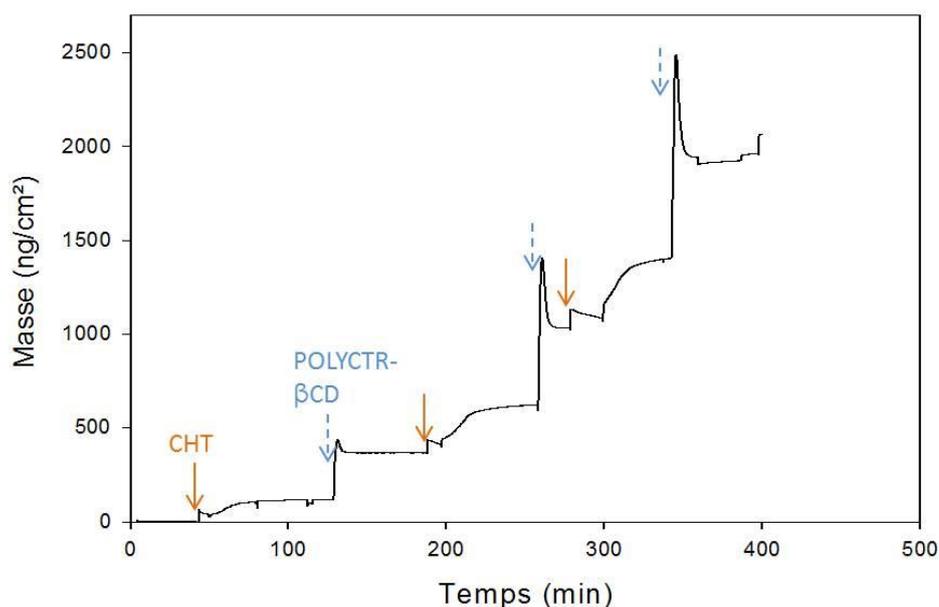


Figure 45 : Evolution de la réponse OWLS pour la formation d'un assemblage à $n = 6$

La Figure 46.a) montre le profil OWLS de la quantité de macromolécules adsorbées par unité de surface pour un film constitué de 13 couches et la Figure 46.b) représente l'évolution générale de la masse et de l'épaisseur calculées en fonction du nombre de couches.

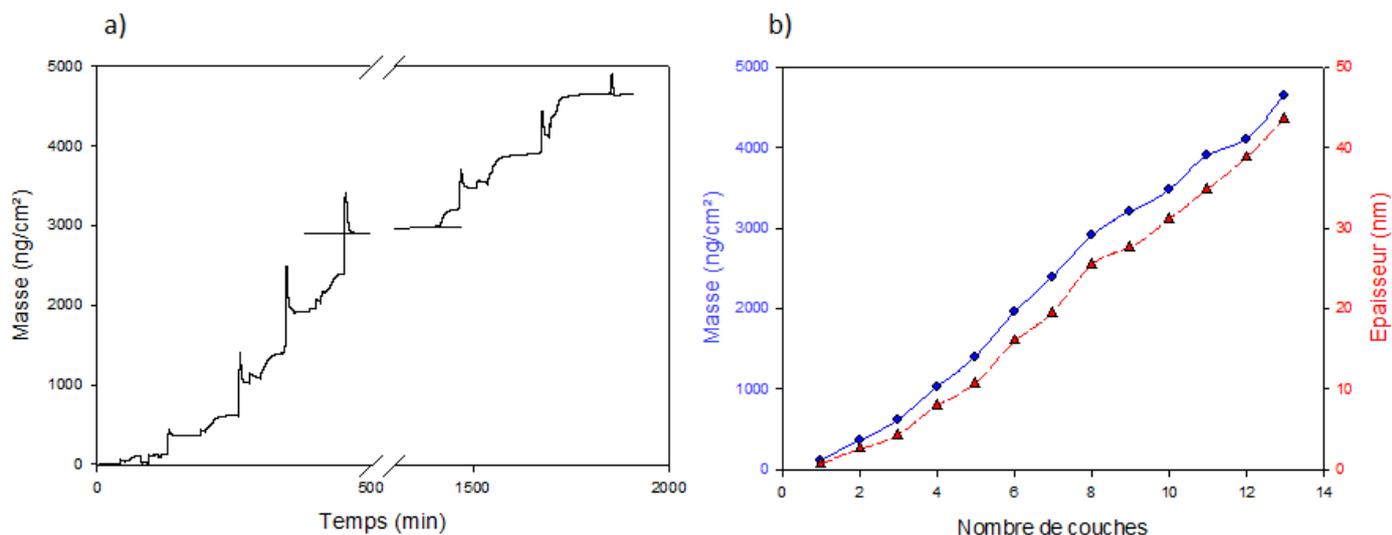


Figure 46 : a) Evolution de la réponse OWLS pour un assemblage à $n = 13$, b) Evolution générale de la masse déposée et de l'épaisseur des couches du système ($n = 13$ au final) en fonction du nombre de couches

Après le dépôt de la première couche, une croissance linéaire de la masse de molécules adsorbées pour le système multicouches considéré est observée avec une épaisseur moyenne par couche de 2,85 nm.

II.1.2. Influence de la force ionique

Lors de la description des facteurs pouvant influencer la construction des assemblages dans le chapitre bibliographique, il a été démontré que la force ionique pouvait jouer un rôle de modulation dans les propriétés du film multicouches^{106,129}, en termes d'épaisseur ou de rugosité. La Figure 47 reporte l'influence de la force ionique sur l'épaisseur des assemblages multicouches.

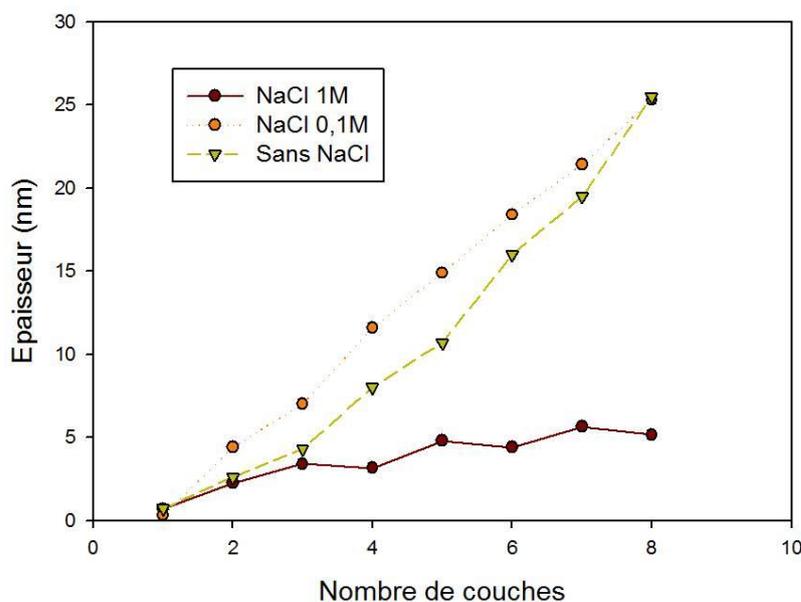


Figure 47 : Profil OWLS de l'épaisseur d'assemblages obtenues par LbL avec des solutions de PE à différentes forces ioniques ($n = 8$)

Comme observé, une force ionique élevée (1 M) perturbe fortement la construction, conduisant à des épaisseurs de couches bien moindre que lorsque celle-ci est faible (0,1 M) ou nulle. En présence d'une force ionique élevée, il a été montré que la rugosité des couches augmente¹⁰⁶ ce qui perturbe la formation du film. De plus, il est bien connu que les polyélectrolytes s'adsorbent dans une conformation « étendue » (ou « en bâtonnets ») en absence de sel, alors qu'ils ont plutôt tendance à s'adsorber dans une conformation en « boucle » en milieux salins^{102,105}. En effet, dans ce cas, les effets d'écrantage des charges prennent le pas sur les interactions ioniques entre PE+ et PE-. De manière générale, une faible force ionique favorise la complexation de macromolécules de charge opposée alors qu'une force ionique plus élevée tend à rompre les interactions électrostatiques (par écrantage des charges portées par les deux PE) pouvant causer la désorption des couches précédemment déposées par effet de gonflement du système¹³⁴ comme mentionné dans le chapitre bibliographique. Dans notre cas, seul le CHT peut adopter ces différentes conformations puisque le

polyCD est un réticulat se présentant sous forme de nano-objets dont la forme plus ou moins rigide interdit le changement de conformation.

Au vu de ces résultats, une construction des multicouches à partir de solutions de PE+ et PE- en l'absence de sel a été privilégiée dans toute la suite de l'étude.

II.1.3. Influence du pH

Les groupes COOH du polyCD et NH₂ du chitosan sont des groupes ioniques faibles, c'est-à-dire que leur ionisation dépend du pH ionique (pKa NH₃⁺/NH₂ = 6,2 à 7,32 pour le chitosan¹⁸⁶, pKa COOH/COO⁻ = 3,1 à 6,4 pour le polyCTR-βCD). Le CHT n'est pas soluble pour des pH > 5, et le pH de la solution de PE+ (CHT dans AcOH 10 mL/L) se situe autour de 3. De ce fait, nous avons testé des conditions fortement acides pour la construction des assemblages.

L'OWLS a révélé qu'à pH < 2, il n'est pas possible d'adsorber le polyCTR-βCD sur la première couche de CHT. Ceci s'explique par le fait qu'à ce pH, le polyCTR-βCD est principalement sous sa forme non chargée (groupements COOH) et donc n'interagit pas de manière électrostatique avec le CHT chargé positivement.

II.2. Construction LbL sur textile

Toute cette étude est réalisée avec le chitosan de bas poids moléculaire (CHT-B).

Il s'agit ici, de déterminer les concentrations idéales en polyélectrolytes pour avoir les adsorptions et dépôts maximums au cours de la construction des assemblages selon la Voie 1 (cf. Figure 41).

Une tentative de construction multicouche a été réalisée sur des échantillons dont les charges sur le PET ont été obtenues par hydrolyse (voie H2, 5 et 30 min) et dont la CEI maximale est de 71 μmol/g. Ces échantillons n'ont montré aucun gain de masse, même après tentative de construction jusqu'à 6 couches, ce qui signifie qu'il n'y a pas eu de construction des assemblages sur ce support. Dans ce cas, la densité de COO⁻ est insuffisante. En effet, elle est 10 fois inférieure à celle obtenue sur le textile thermofixé (700 μmol/g), qui va, comme on va le voir par la suite, donner de biens meilleurs résultats. Ces résultats confirment la nécessité d'une importante densité de charge pour la construction des assemblages et c'est pourquoi, le PET thermofixé est donc choisi comme support pour toutes les constructions.

II.2.1. Dépôt de la première couche auto-assemblée (CHT, n=2)

Dans un premier temps, une optimisation de la concentration de la solution de CHT (pH = 3,7) est réalisée et les résultats sont présentés en Figure 48.

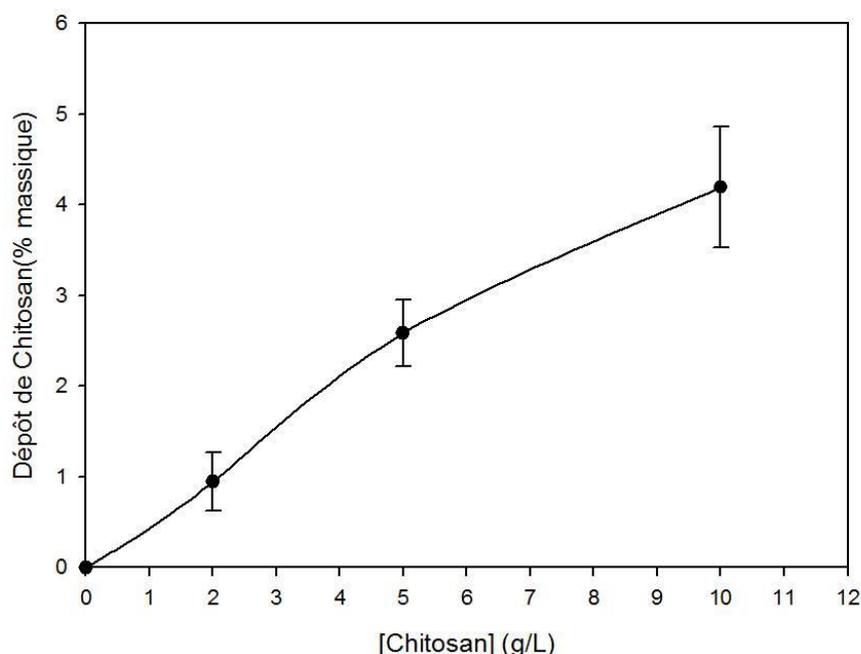


Figure 48 : Optimisation de la concentration en CHT pour le dépôt de la couche n°2 sur le PET thermofixé ([CHT B] = 0 à 10 g/L, rinçage [AcOH] = 3 mL/L)

Une évolution croissante du dépôt multicouches en fonction de la concentration en CHT est observée, jusqu'à atteindre 4,2 %-wt de gain de masse pour une concentration en CHT de 10 g/L. Toutefois, il a été montré que des concentrations supérieures à 5 g/L entraînaient une viscosité trop importante de la solution de CHT. Dans ce cas, le dépôt n'a plus uniquement lieu grâce aux interactions ioniques mais également grâce à une enduction du support par une couche visqueuse de CHT, dont la stabilité ne dépend plus principalement d'interactions ioniques mais par enchevêtrement du polymère dans le réseau des fibres. La concentration à 5 g/L est donc sélectionnée et le gain de masse moyen de l'échantillon textile pour cette couche de chitosan est de 2,5 %-wt.

Une tentative de dépôt de la seconde couche de CHT a également été réalisée à pH acide (pH < 2). Une fois encore, l'adsorption est impossible et aucun gain de masse n'est observé prouvant la déposition par interactions ioniques de cette seconde couche, ce qui corrobore les résultats déjà obtenus par OWLS (cf. II.1.3).

II.2.2. Dépôt de la seconde couche auto-assemblée (polyCD, n=3)

La 3^{ème} couche est construite avec la solution de polyCTR- β CD. Une optimisation, afin de déterminer la concentration maximale pour avoir le gain de masse le plus élevé pour cette couche, est réalisée (cf. Figure 49).

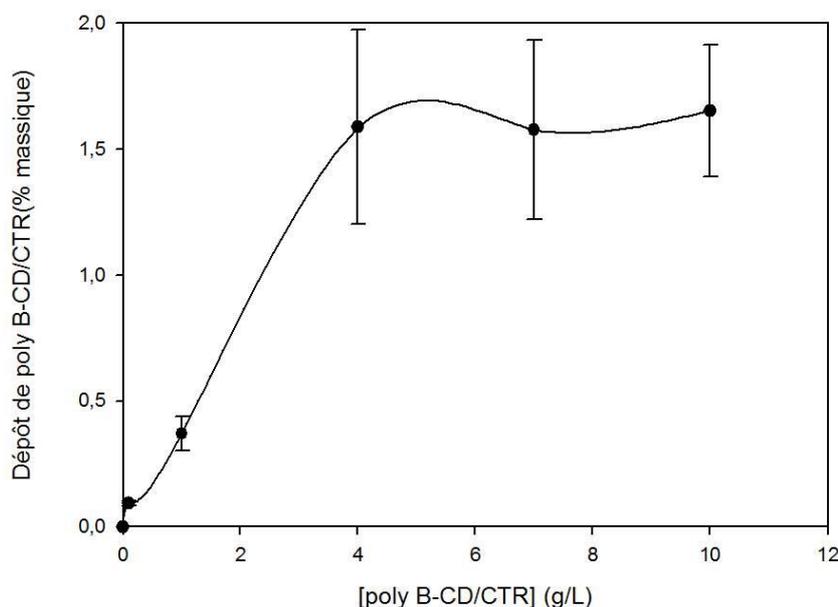


Figure 49 : Optimisation de la concentration en polyCTR- β CD pour le dépôt de la couche n°3 ([polyCTR- β CD] = 0 à 10 g/L dans H₂O, rinçage H₂O)

A partir de 4 g/L, une saturation de l'échantillon textile est observée, et le gain de masse du support se stabilise pour atteindre un palier à 1,58 %. Cette concentration de 4 g/L permet donc d'avoir le dépôt de PE- le plus important et sera appliquée à toutes les solutions de PE- dans le procédé LbL.

Pour résumer, le Tableau 17 suivant présente les concentrations (= conditions C) optimisées pour chaque solution de PE. Ces dernières seront utilisées pour toute la suite de l'étude.

Tableau 17 : Conditions optimisées pour la construction des assemblages multicouches

PE	Concentration C	Solvant	Rinçage
CHT	5 g/L	AcOH 10 g/L	AcOH 3 g/L
PolyCD	4 g/L	H ₂ O	H ₂ O

II.2.3. Assemblages LbL sur textile (n > 3)

II.2.3.a) Influence des concentrations de CHT et de polyCD

En utilisant les concentrations C de PE+ et PE- optimisées précédemment, les films multicouches sont construits sur textile par trempage successifs dans les solutions de polyélectrolytes, selon le principe du « dip coating » (Voie A représentée dans la Figure 41). La Figure 50 présente les résultats du gain de masse (GM) de ces assemblages en utilisant les concentrations C optimisées dans les paragraphes précédents et celles-ci divisées par 2.

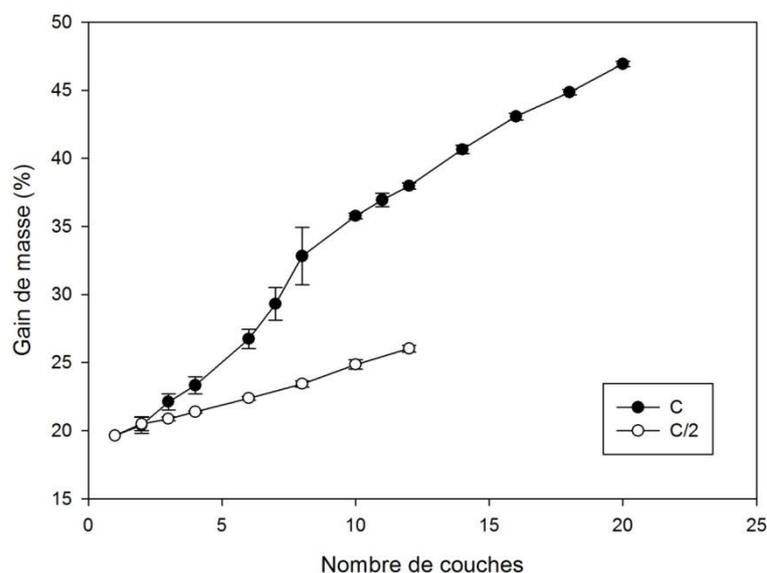


Figure 50 : Evolution du gain de masse cumulé en fonction du nombre de couches sur le support PET thermofixé d'assemblages construits avec les conditions C et C/2

Le GM de départ de l'échantillon après thermofixation, est de 19,6 %-wt. On observe une forte répercussion des concentrations sur la construction des assemblages puisque la concentration C/2 conduit à des dépôts bien moins importants à chaque couche.

Après 20 couches, le GM total mesuré dans les conditions optimisées est de 47 %-wt sur le PET vierge, dont 27,4 %-wt correspondant à la construction par la technique LbL et 19,6 %-wt correspondant à la première couche de polyCTR- β CD thermofixée. Ces valeurs correspondent à un GM moyen de 1,4 %-wt par couche adsorbée, sans distinction entre leur nature anionique ou cationique.

Un dosage spectrophotométrique par l'acide orange a été réalisé afin de déterminer les quantités de CHT déposées à la surface. La Figure 51 présente les résultats de l'étude comparative des deux techniques sur des échantillons présentant différents nombres de couches auto-assemblées.

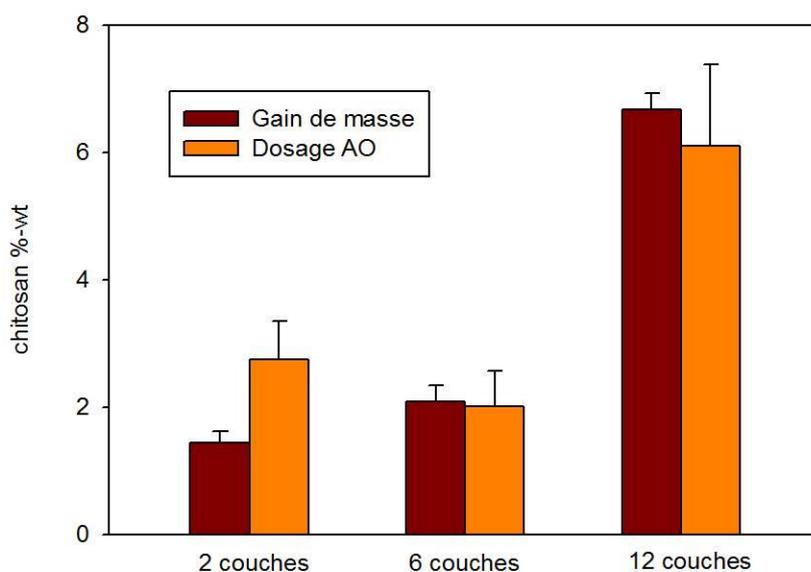


Figure 51 : Détermination du taux de CHT présent dans les assemblages en fonction du nombre de couches

Le dosage par l'acide orange montre une bonne corrélation entre les deux méthodes et l'on observe l'augmentation du taux de chitosan déposé avec le nombre de couches 1,5 %, 2,1 %, et 6,7 % pour 2, 6 et 12 couches respectivement. Le même comportement est reporté par gravimétrie, en particulier pour les échantillons avec le plus haut taux de chitosan, ce qui confirme la formation des assemblages multicouches.

II.2.3.b) Influence de la masse molaire du CHT

Les CHT de bas et moyen poids moléculaires (CHT-B et CHT-M) ont simultanément été utilisés pour superposer des couches auto-assemblées à la surface du support thermofixé. Comme montré en Figure 52.a), en suivant le profil OWLS de la quantité de molécules adsorbées par unité de surface, il n'y a pas de différence significative entre les constructions réalisées à partir du CHT-B ou du CHT-M. Après 10 couches, les gains de masse sont les mêmes.

Selon les fiches techniques, ces deux CHT ne présentent pas une franche différence entre les deux masses molaires ($50\ 000 < \text{CHT-B} < 190\ 000$ et $190\ 000 < \text{CHT-M} < 310\ 000$). Il est probable que l'on ne puisse pas distinguer les deux CHT en OWLS car c'est la population de macromolécules de CHT de masse molaire la plus élevée qui va s'adsorber préférentiellement sur la surface de la cellule. Il est en effet bien connu que les interactions électrostatiques entre des macromolécules de charge opposée ou entre des macromolécules et une surface engagent de manière privilégiée les molécules

de masses molaires les plus élevées²⁶³⁻²⁶⁵. Dans le cas présent, la différence de masse molaire entre les deux espèces semble trop faible pour pouvoir différencier à l'échelle de l'OWLS des macromolécules de CHT de 200000 et de 300000 g/mol. On retrouve d'ailleurs ce type de résultat dans la littérature : Richert *et al.* ont suivi l'évolution d'assemblage multicouches construits à partir de trois CHT de masse molaire différentes ($1,1 \cdot 10^5$ g/mol, $2,7 \cdot 10^5$ g/mol, $4,6 \cdot 10^5$ g/mol) et ont observé des profils très similaires entre les échantillons présentant les deux masses molaires les plus élevées¹²⁵. Il serait envisageable de tester ici un CHT de masse molaire encore plus faible ($< 20\,000$ g/mol).

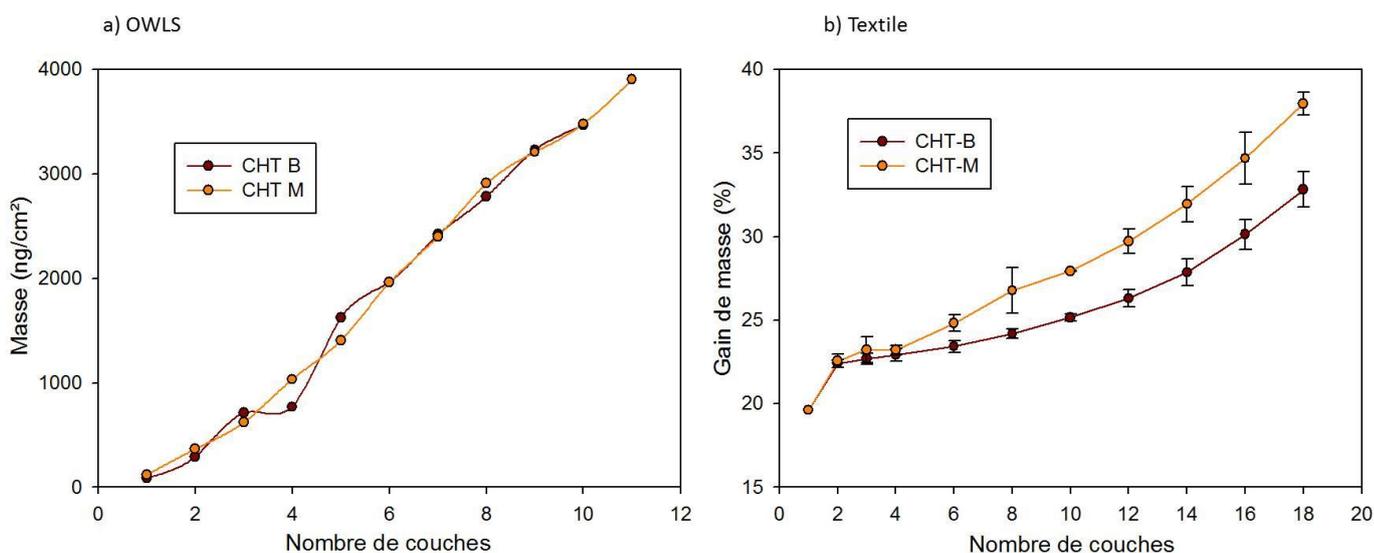


Figure 52 : Evolution du gain de masse cumulé en fonction du nombre de couches sur le support PET thermofixé construites avec les 2 CHT (conditions C) par a) OWLS, b) sur textile par gravimétrie

Cette comparaison entre les CHT-B et CHT-M a également été réalisée sur textile et mesurée par gravimétrie et les résultats présentés en Figure 52.b). On observe cette fois-ci que c'est le CHT-M qui conduit aux dépôts les plus importants. En effet, après 18 couches, le dépôt est de 32,8 % pour le CHT-B et de 38 % pour le CHT-M (soit + 5,2%). Des résultats comparables ont déjà été rapportés dans la littérature où un taux de croissance des assemblages multicouches plus élevés est observé dans le cas de chitosan de plus forte masse molaire (160 000 g/mol contre 31 000 g/mol), conduisant même parfois au passage d'un régime de croissance linéaire à un régime exponentiel²⁶⁶. Plus la masse molaire du polysaccharide est élevée, et plus les couches déposées sont épaisses.

Il faut considérer la grande différence de topographie entre les deux surfaces testées : les cellules OWLS présentent une surface plane et lisse, tandis que le textile présente une structure poreuse et une surface spécifique élevée sur laquelle le PE peut adhérer, non seulement par

interactions ioniques, mais aussi par piégeage des macromolécules dans le réseau fibreux. Par conséquent, il n'est pas anormal que les résultats diffèrent entre les essais réalisés par OWLS et sur textile. Enfin, il faut également rappeler qu'il est souvent difficile voire illusoire de comparer des phénomènes observés à l'échelle macroscopique avec ceux observés à l'échelle nanoscopique où la physique est très différente.

II.2.4. Caractérisation des assemblages LbL sur textile

II.2.4.a) Zétamétrie

Des études sur des films multicouches à base de CHT ont déjà mis en évidence l'alternance des charges sur de la cellulose²⁶⁷ ou autres textiles, au fil des dépôts anioniques et cationiques à la surface. La Figure 53 représente l'évolution du potentiel zéta en fonction de la couche déposée à la surface des échantillons de PET, dans les premières étapes de constructions (4 couches). L'étude a été réalisée à un pH de 4, de sorte que le chitosan et le polyCTR- β CD soient tous deux sous leurs formes ioniques (pK_a $NH_3^+/NH_2 = 6,2$ à $7,32$ pour le chitosan¹⁸⁶, pK_a $COOH/COO^- = 3,1$ à $6,4$ pour le polyCTR- β CD).

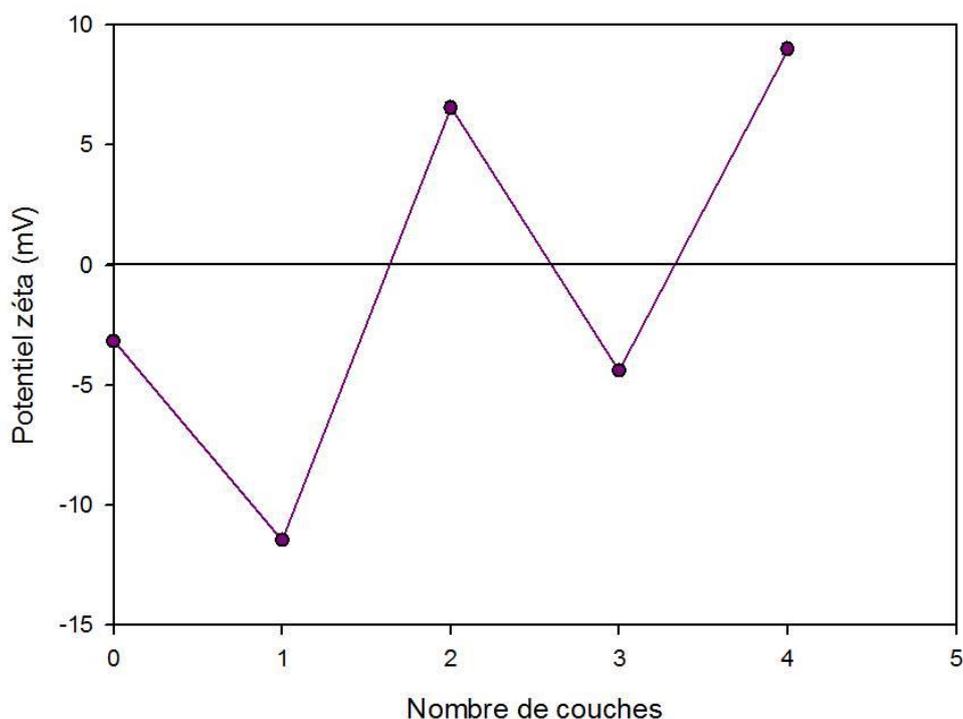


Figure 53 : Evolution du potentiel zéta en fonction des couches déposées à la surface du PET à pH = 4, conditions C

A pH = 4, le PET vierge présente un potentiel zêta légèrement négatif (- 3 mV) du à son hydrophobicité, en accord avec des résultats déjà publiés²⁶⁸. Après l'étape de thermofixation, le potentiel zêta diminue jusqu'à atteindre - 11 mV, en réponse aux fonctions carboxylates présentes dans le polymère de polyCTR- β CD réticulé. Une première inversion est observée après le dépôt de la couche de CHT (+ 6mV) et la seconde intervient après l'adsorption de la 3^{ème} couche lorsque les charges du polyCTR- β CD compensent celles du CHT en surface (- 4 mV). L'écart constaté entre les valeurs du potentiel zêta pour les couches anioniques, thermofixées ou adsorbées, s'explique par la densité de charge présente, dépendant de la technique utilisée. En effet, par thermofixation, la densité de charge est très importante (GM = 19,6 %-wt, CEI = 0,7 mmol/g), tandis qu'elle est plus faible au niveau des couches auto-assemblées (GM = 1,4 % par couche). Finalement, la seconde couche de CHT présente à nouveau un potentiel zêta positif (+ 9 mV). Ces résultats confirment l'alternance des couches anioniques et cationiques sur la surface du textile au fil du processus de construction.

II.2.4.b) Microscopie

La microscopie permet de visualiser le dépôt multicouches à l'échelle du non-tissé. Dans un premier temps la microscopie optique, représentée en Figure 55, permet de visualiser clairement la réduction des pores du textile, c'est-à-dire le comblement des interstices entre les fibres, mettant en évidence le dépôt.

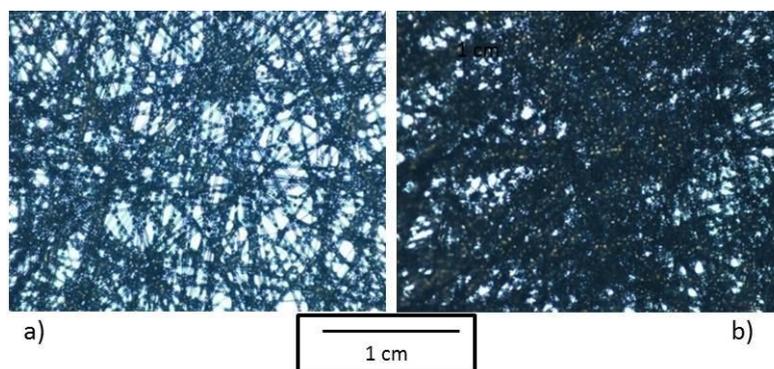


Figure 54 : Image de microscopie optique (x 5) du : a) PET Vierge et b) Assemblage n = 4, conditions C

La fonctionnalisation est également observée par MEB (cf. Figure 55). En fonction du nombre de couches à la surface, une déposition significative sur les fibres est observable, avec un comblement partiel des espaces entre les fibres. De plus, une augmentation du diamètre des fibres entre le PET Vierge (a), le PET thermofixé (b) et le PET 12 couches (d) est visible, ce qui confirme l'enrobage des films lors du processus de construction des assemblages multicouches.

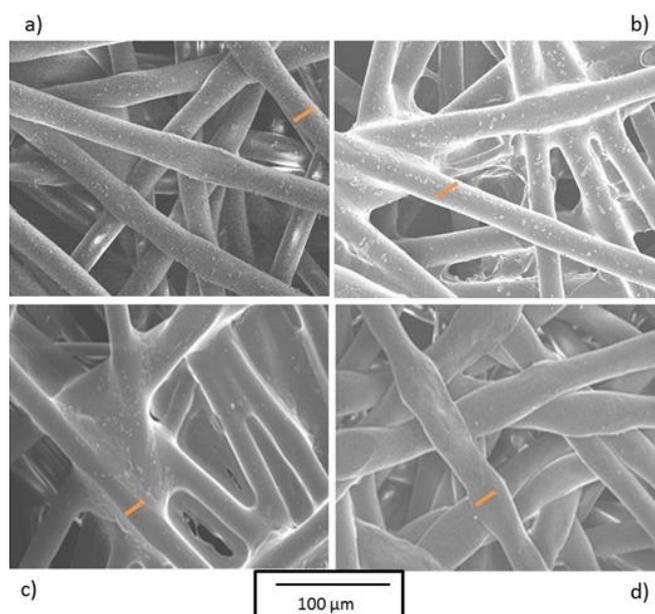


Figure 55 : Images MEB (x 400) de : a) PET Vierge, b) PET thermofixé (10/3/10, 150 °C, 30 min), c) PET n = 4, d) Assemblage n = 12 ; conditions C

II.2.4.c) Analyse thermogravimétrique

La Figure 56 révèle les courbes d'ATG des deux polyélectrolytes, du textile avant puis après thermofixation (150 °C, 30 min) et empilement de 20 couches ([CHT] = 0,5 %-wt et [polyCTR-βCD] = 0,4 %-wt, GM = 46,6 %-wt). En dessous de 200 °C, la petite perte de masse peut être attribuée à la déshydratation des polymères. Ensuite, la dégradation thermique du PET Vierge apparaît à 410 °C tandis que celles du CHT et du polyCTR-βCD sont visibles respectivement à 286 °C et 306 °C respectivement. En considérant la différence de température de dégradation entre le support vierge et les deux polymères, le profil de dégradation du PET à n = 20 couches (e) montre clairement la fonctionnalisation du textile par les polyélectrolytes à travers un palier intermédiaire à 298°C qui révèle la décomposition thermique des deux PE. On ne peut pas distinguer la dégradation des deux polymères car, ce sont tous deux des polysaccharides et ils présentent donc des températures de dégradation similaires. La contribution du polyCTR-βCD est toutefois majoritaire par rapport à celle du CHT puisque, pour des assemblages à 20 couches, les quantités déposées sont différentes : 34 % et 13 % de gain de masse respectivement.

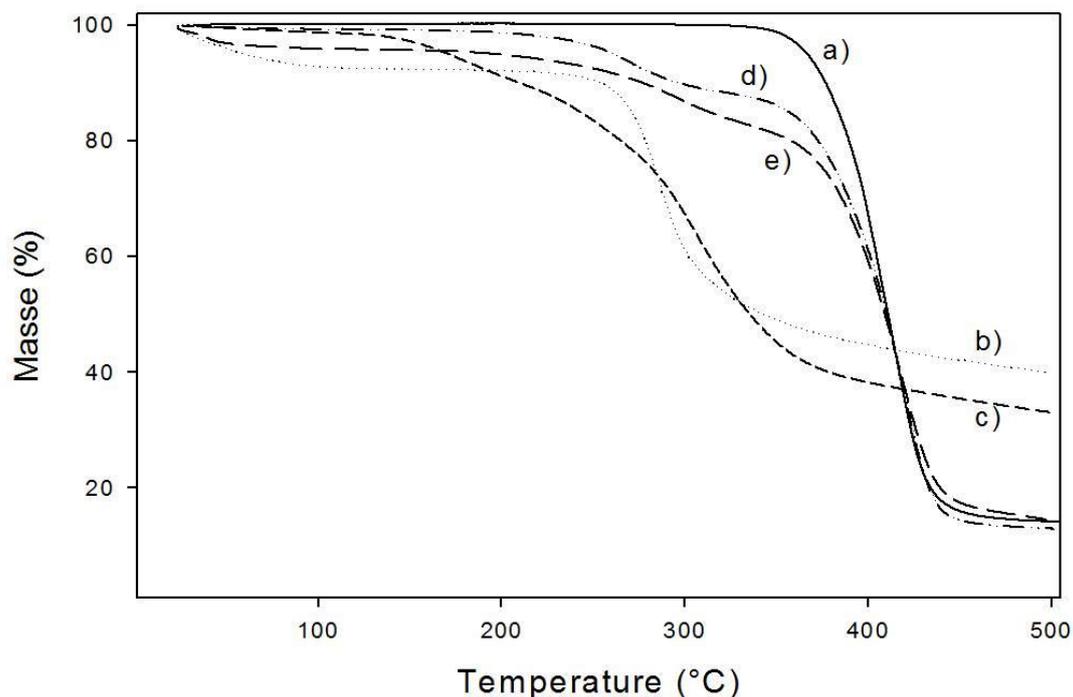


Figure 56 : Courbes ATG (5°C/min) du: a) PET Vierge, b) poudre de chitosan, c) poudre de polyCTR-βCD, d) PET thermofixé (150°C, 30min), e) Assemblage n = 20, conditions C

II.2.4.d) Analyses Infra-rouge

Les spectres IR présentés en Figure 57, montrent que le CHT et le polyCTR-βCD présentent tous les deux les bandes caractéristiques des polysaccharides : l'élongation des hydroxyles, les groupes amino (pour le CHT) et carboxyliques (pour le polyCTR-βCD) sont révélés par la large bande d'absorption à 3300 cm^{-1} . L'élongation des COOH et des esters (COOR) du polyCTR-βCD peut être visualisée à 1700 cm^{-1} , et à 1100 cm^{-1} l'élongation des liaisons C-O-C est clairement visible sur les deux spectres a) et b). Le spectre ATR du textile modifié par 20 couches montre une superposition du spectre du PET vierge et des spectres des deux polyélectrolytes, confirmant ainsi le dépôt des PE sur le support textile.

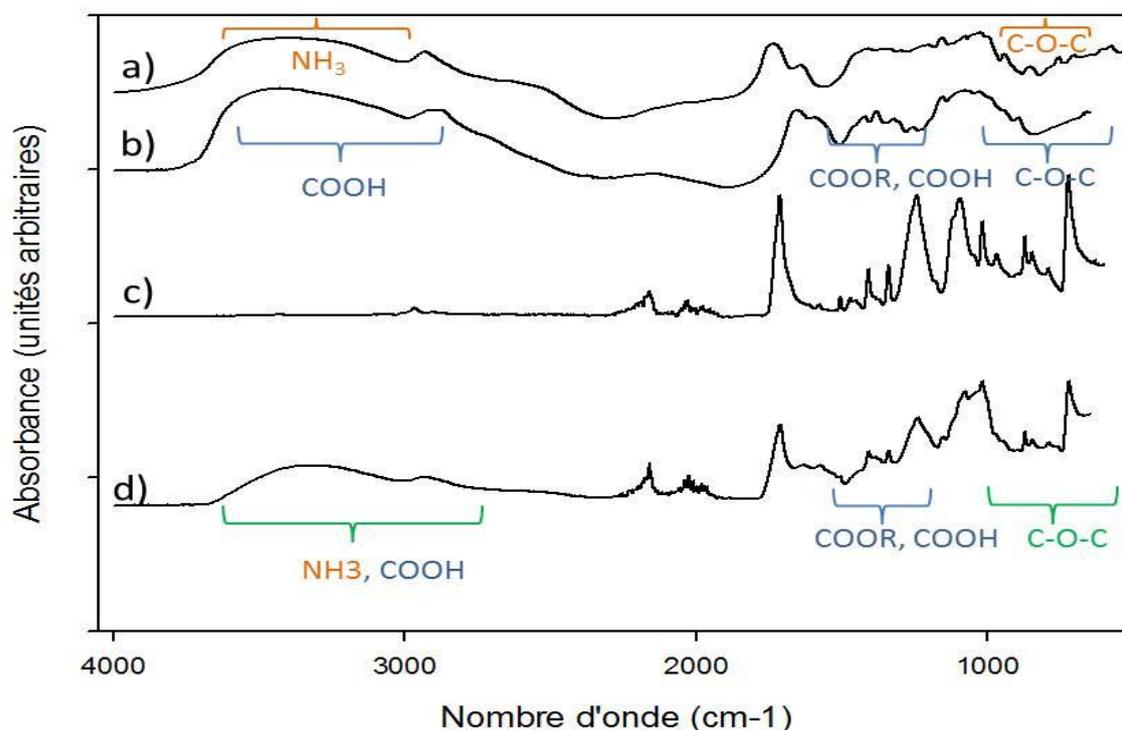


Figure 57 : Spectre IRTF, en mode transmission par pastilles de KBr de : a) poudre de chitosan, b) poudre de polyCTR- β CD, en mode ATR c) PET Vierge, d) Assemblage $n = 20$; conditions C

II.3. Stabilité des assemblages en systèmes batch

Une fois construits, la stabilité de ces assemblages dans les différents milieux aqueux (neutre, acide acétique ou basique) a été étudiée.

Comme rapporté dans la partie bibliographique, l'environnement peut avoir une réelle influence sur la stabilité des assemblages ou sur leur désintégration¹³⁴. Selon les conditions, il peut y avoir différents éléments perturbateurs induisant l'écrantage des charges ou la déstructuration plus ou moins rapide des couches par exemple. Aux conditions environnementales (conditions extrinsèques) s'ajoutent les propriétés intrinsèques de l'assemblage qui peuvent être modulées par l'ajustement de la masse molaire des PE, et par une post-réticulation de l'assemblage LbL. On peut s'attendre à ce que ces facteurs n'influent pas seulement sur la stabilité du film, mais agissent aussi sur la vitesse de libération du principe actif qu'il séquestre. Il a en effet été montré qu'une réticulation des films multicouches pouvait accroître leur cohésion et donc limiter la déstructuration¹³⁶. De plus, une augmentation de la masse molaire peut jouer sur la conformation du polymère en solution et ainsi modifier l'épaisseur des couches ou la rugosité de celles-ci^{266,269}. On

cherche ici à obtenir des assemblages dont on pourrait maîtriser la stabilité et la sensibilité à la dégradation au cours du temps. Dans cette logique, nous avons utilisés les deux CHT de masses molaires différentes, CHT-B et CHT-M ($50\ 000 < \text{CHT-B} < 190\ 000$ et $190\ 000 < \text{CHT-M} < 310\ 000$) pour construire le film LbL, et avons réalisé sa post-réticulation par la génipine.

Tous les assemblages sont construits selon la technique de dip-coating décrite dans la partie Matériel et Méthodes et dont les paramètres optimaux ont été discutés ci-avant (VOIE A).

II.3.1. Influence du milieu

La Figure 58 suivante présente les profils de dégradation d'échantillons à 12 couches construit avec le CHT-B mis en batch dans quatre solvants différents (eau, acide acétique AcOH, PBS, MEM). La couche de polyCTR- β CD thermofixée sur le PET vierge est représentée à 19,6 %.

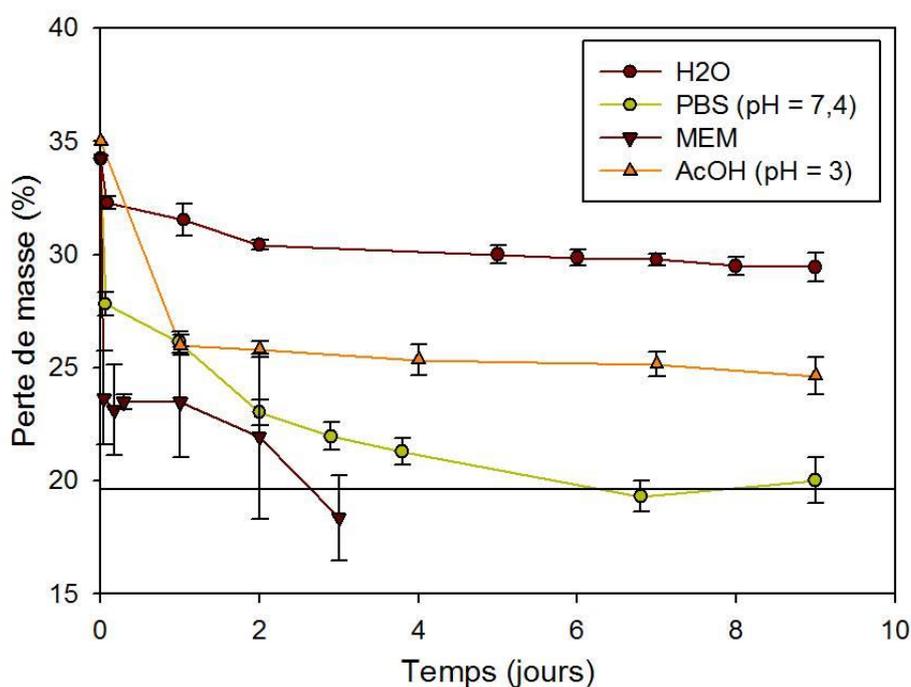


Figure 58 : Suivi de la dégradation des échantillons ($n = 12$, conditions C) en fonction du temps, dans l'eau, le PBS, et le milieu MEM

La dégradation dans l'eau est très lente et le système multicouche est à peine érodé après 9 jours. Cependant, les comportements sont radicalement différents lorsque l'échantillon est introduit dans l'acide acétique, le PBS ou le milieu MEM. Un milieu acide permet la solubilisation du CHT et donc déstabilise les assemblages, ce qui conduit à des pertes de masse plus importantes que dans

l'eau. Le PBS quant à lui, est un sel qui peut induire de fortes perturbations dans les assemblages multicouches construit à partir d'interactions ioniques, comme la rapide désorption des couches^{134,138}. C'est pourquoi la dégradation est encore plus rapide que dans l'eau ou l'acide (9 jours pour déstructurer l'assemblage multicouches). Par ailleurs, le MEM, qui s'apparente au plasma, présente aussi une force ionique importante, de même qu'un taux élevé de protéines supportant des groupes ionisés²⁷⁰ en solution, ce qui provoque la dégradation la plus rapide de tous les milieux testés. Au bout de 3 jours, tout le système multicouche est déstructuré.

En effet, en présence de sel ou d'une force ionique élevée ou d'autres espèces chargées en solution, les interactions intrinsèques PE+/PE- diminuent au profit des interactions extrinsèques PE+/anions libres (les ions phosphate dans le cas du PBS) et PE-/cations libres (les ions sodium dans le cas du PBS). Un phénomène de gonflement des couches apparaît conduisant à la désorption de celles-ci^{134,138} et à la dégradation progressive des assemblages adsorbés.

II.3.2. Influence de la réticulation

Le film multicouches a été réticulé par la génipine selon deux objectifs :

- Stabiliser l'assemblage LbL et le rendre plus résistant aux milieux de force ionique élevée
- Créer un réseau polymère réticulé qui ralentisse la libération du principe actif

La génipine est un extrait de plante relativement cher (25 mg = 85€, Sigma Aldrich) et il s'agit d'en utiliser le moins possible pour avoir les effets escomptés. De plus, cet extrait est considéré comme toxique¹⁵⁴ uniquement sous sa forme libre, il est donc important de l'utiliser en défaut par rapport au CHT pour éviter la présence de génipine résiduelle dans le film LbL.

Des assemblages construits avec le CHT-B uniquement et réticulés par des solutions à différents taux de génipine sont étudiés dans les quatre milieux (n = 20 pour : Eau, PBS, milieu acide ; n = 12 pour MEM).

Tout d'abord, la réaction des fonctions amines avec la génipine est bien mise en évidence sur les échantillons grâce à la coloration bleue obtenue (cf. Partie II, III.3.1), comme montré en Figure 59 dont l'intensité augmente avec la concentration utilisée en génipine.

Rappel : 20C G0,01% correspond à un assemblage de 20 couches réticulées par la génipine de concentration 0,01% (w/v).

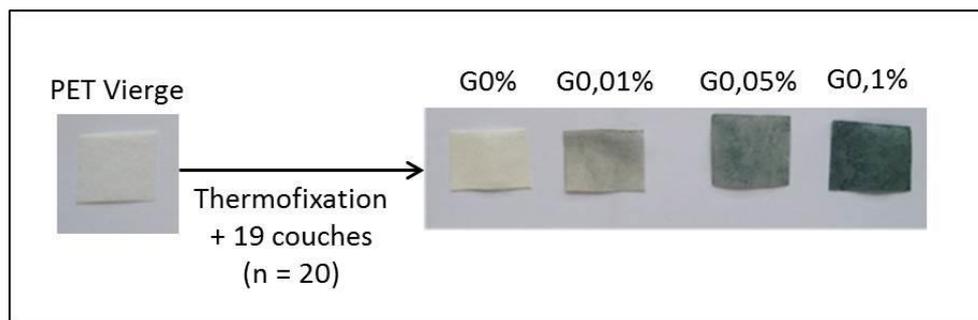


Figure 59 : Echantillons à $n = 20$ (conditions C) après réticulation par la génipine à différentes concentrations

II.3.2.a) Influence de la réticulation dans les 4 milieux

Les échantillons réticulés et non-réticulés sont mis en batch dans les différents milieux et leur dégradation est suivie par gravimétrie. Les résultats obtenus dans les quatre milieux sont donnés en Figure 60. Afin de ne pas surcharger les graphiques, les écart-types n'apparaissent pas. Néanmoins, ils représentent de 5 à 10% de la valeur représentée.

Tout d'abord, le PET vierge étant biostable, il ne se dégrade pas au cours du temps. Dans l'eau (Figure 60.a)), on constate une dégradation lente et linéaire des échantillons sur 38 jours. Il n'y a pas de différenciation observable entre les échantillons réticulés et non réticulés. Après 37 jours, la perte de masse est de l'ordre de 10 à 15 % pour tous les échantillons, cependant les plateaux ne sont pas encore atteints après ces 37 jours. Le test de dégradation a été poussé plus loin pour un échantillon à 20 couches sans réticulation dans l'eau, et il présente un plateau de dégradation après 70 jours.

Le PBS est un milieu qui se rapproche plus d'un milieu physiologique et il est connu qu'un tel milieu salin est propice à la déconstruction partielle ou totale des assemblages multicouches en solution^{134,138}. Dans le PBS (Figure 60.b)), l'échantillon thermofixé montre une dégradation à peu près similaire à celle observée dans l'eau : il n'y a pas d'influence du sel sur la dégradation de la couche thermofixée. Par contre, une dégradation plus prononcée des échantillons modifiés par le film multicouche avec et sans réticulation est bien visible. Ici, on peut distinguer une stabilisation des films LbL lorsque ceux-ci ont été réticulés par la génipine concentrée à 0,05 % et 0,1 %, tandis que la force ionique du PBS conduit à la dégradation presque totale de l'ensemble du coating après 30 jours pour les échantillons $n = 20$ non réticulés et réticulés par la génipine de concentration 0,01 %.

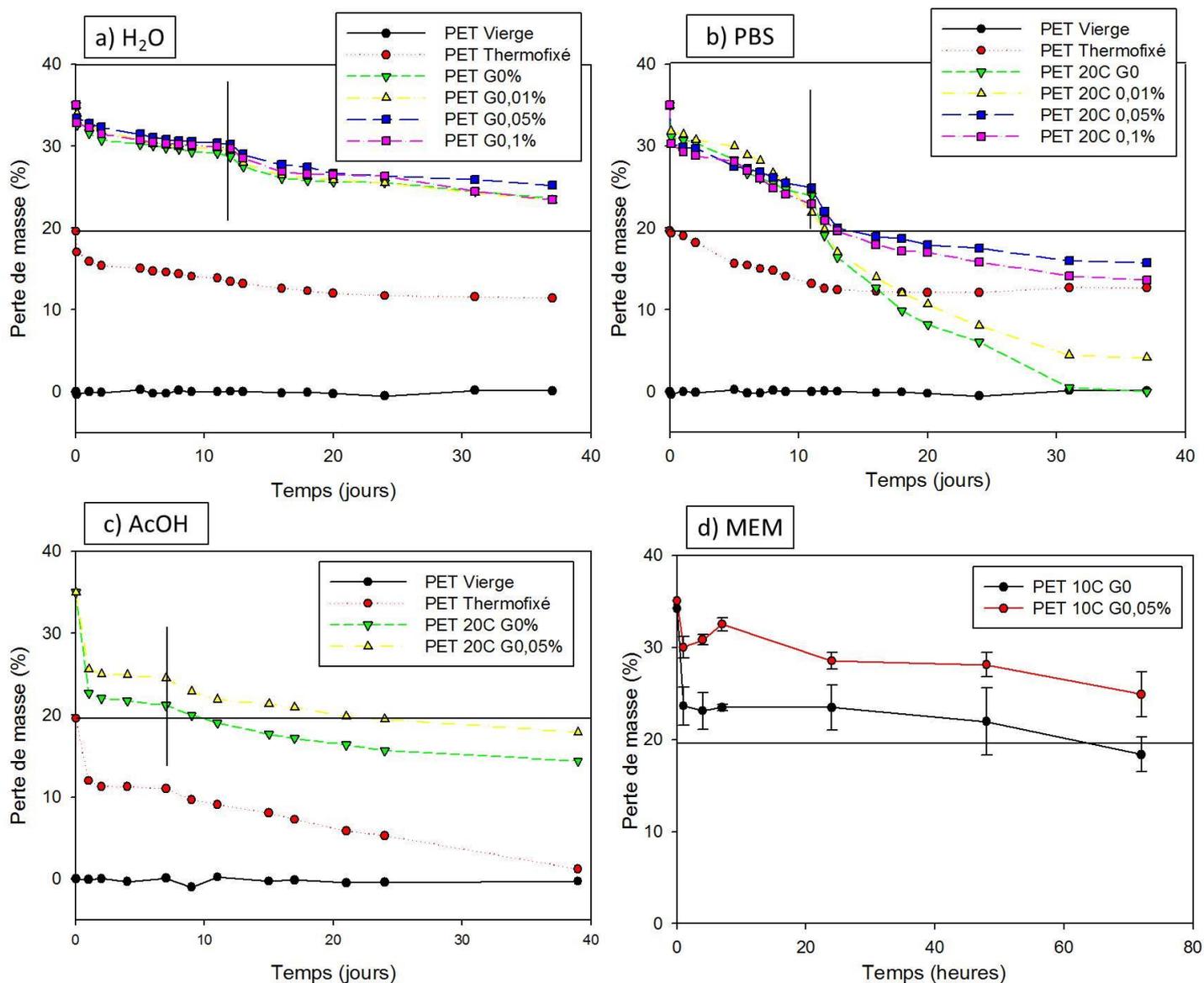


Figure 60: Profils de dégradation d'échantillons réticulés par différents taux de génipine (conditions C), dans les quatre milieux testés a) H₂O (n=20), b) PBS (n=20), c) Acide (n=20), d) MEM (n=12)

Dans le PBS, la dégradation complète du système non réticulé PET 20C G0 est observée, alors que la couche thermofixée du PET thermofixé ne se dégrade pas complètement et atteint un palier (12%) à partir de 20 jours. Une hypothèse pour expliquer ce phénomène est la fragilisation de la couche thermofixée sous-jacente lors du procédé de dip-coating. En effet, les dépôts et rinçages des couches de CHT se font en milieu acide, or les fonctions esters du polyCD thermofixé sont hydrolysables dans ce milieu. De ce fait, il est probable que, lors de la construction des assemblages, une érosion de la couche thermofixée ait lieu (cf. Figure 61).

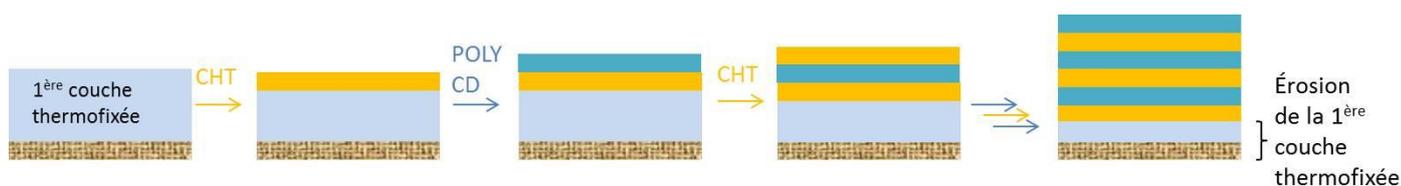


Figure 61: Schématisation de l'érosion de la 1ère couche thermofixée lors du processus de dip-coating

Pour permettre une dégradation moins importante de cette première couche, il est envisageable de modifier les paramètres de thermofixation (150°C, 30 min) en agissant sur la température et le temps de réticulation afin de fixer plus fermement le polymère sur les fibres⁸⁷. Cela n'empêcherait pas l'hydrolyse dans les conditions acides mais aurait un effet probable dans l'eau ou le PBS.

En milieu acide (cf. Figure 60.c)), on observe une dégradation parallèle des échantillons thermofixé et recouverts de 20 couches. Après 40 jours, il reste un peu moins de 20 % de coating sur le textile pour les échantillons ayant subi le dépôt LbL, alors que tout est hydrolysé pour l'échantillon thermofixé. On peut déduire de ce résultat que l'acide acétique dégrade le polyCTR- β CD de la première couche thermofixée, ce qui valide les hypothèses émises précédemment sur l'érosion de cette première couche. La réticulation par la solution de génipine à 0,05 % apporte une légère stabilisation de l'assemblage (différence de perte de poids de 4%). Toutefois, la différence est beaucoup moins perceptible que celle observée dans le PBS. En milieu acide, la destruction de l'assemblage LbL est provoquée par l'hydrolyse du polyCTR- β CD thermofixé ou auto-assemblé. En revanche, la solubilisation du CHT dans la solution acide ne semble pas se produire ce qui signifie que les interactions CHT/ polyCTR- β CD sont assez stables. Nous nous attendions à ce que l'AcOH provoque une solubilisation rapide du système LbL à cause de la solubilisation du CHT dans ce milieu. Or, ce n'est pas tout à fait le cas, car ici, c'est la couche thermofixée qui est fragilisée.

Un test de dégradation dans le milieu MEM est également réalisé. En effet, si le PBS, de par sa force ionique et son pH, se rapproche de la composition d'un milieu physiologique, il n'en reste pas moins un milieu artificiel. Le plasma contient également des protéines, qui sont chargées négativement pour la plupart, qui peuvent également avoir une influence importante sur la déstructuration des assemblages²⁷⁰ en rentrant en compétition avec le PE de charge opposée. Les résultats de dégradation sur les assemblages dans le milieu MEM (n = 12), avec et sans réticulation par la génipine (0,05%) présentés en Figure 60.b) montrent des phénomènes de dégradation accélérés (3 jours).

Une dégradation subite après 1 h, pour atteindre 10 % de perte sur les 15 % correspondant au film LbL, est observée pour les échantillons non réticulés. Suite à cette perte, la dégradation ralentit pour atteindre 18,4 % après 72 h. La réticulation par la génipine permet de ralentir la dégradation en réduisant la chute de masse initiale (5 % de perte au lieu de 10 %). Dans ce cas, le milieu MEM induit une dégradation relativement rapide mais, grâce à la réticulation du CHT-B, une stabilisation des échantillons est à noter, permettant de ralentir visiblement le phénomène sur 3 jours de suivi.

II.3.2.b) Synthèse des résultats

La Figure 62 présente les profils de dégradation des échantillons dans l'eau, le PBS et l'acide acétique des échantillons non réticulés et réticulés par la génipine (0,05%). Dans l'eau, la dégradation du coating est lente et il n'y a pas d'effet flagrant de la post-réticulation du film LbL. En revanche dans le PBS, on observe une désintégration du film LbL par destruction du complexe polyélectrolytique. Le rôle stabilisant de la génipine est bien visible (+ 11 %) dans ce milieu. Dans le milieu acide, la perte de matière est immédiate due à une hydrolyse d'une fraction du polyCTR- β CD thermofixé suivi de la dégradation plus progressive du film, avec un effet stabilisant modéré de la réticulation. Cette expérience, confrontée à celle réalisée dans le PBS, a montré que le polyCTR- β CD thermofixé était progressivement dégradé par l'acide. Lors du procédé de dip-coating, on fragilise donc petit à petit cette couche de polyCTR- β CD thermofixé lors de chaque trempage dans la solution acétique de CHT.

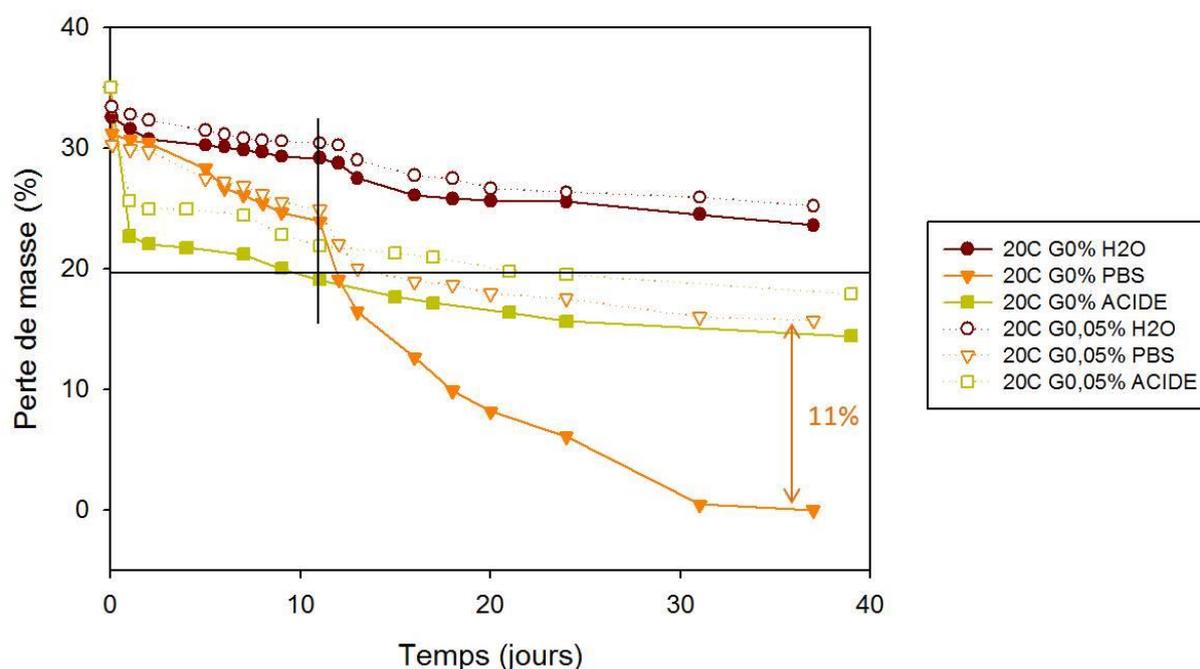


Figure 62 : Profil de dégradation dans les 3 milieux pour $n = 20$ (conditions C), des échantillons non réticulés et réticulés par la génipine (0,05%)

Dans le milieu MEM, les phénomènes sont encore plus rapides (3 jours) et la réticulation à la génipine, en renforçant la cohésion des assemblages, autorise une modification du profil de dégradation, sans modifier sa cinétique.

II.3.3. Influence de la masse molaire du CHT

Les résultats précédents ont permis de mettre en évidence que le PBS et le MEM semblent être les milieux dans lequel la dégradation est la plus importante et la plus rapide. La dégradation d'échantillons construits avec les deux chitosans de l'étude ($50\,000 < M_v(\text{CHT-B}) < 190\,000$ g/mol et $190\,000 < M_v(\text{CHT-M}) < 310\,000$ g/mol) a été étudiée dans ces deux milieux. La Figure 63 présente les résultats de cette étude comparative sur les échantillons dans les deux milieux (a) PBS et (b) MEM.

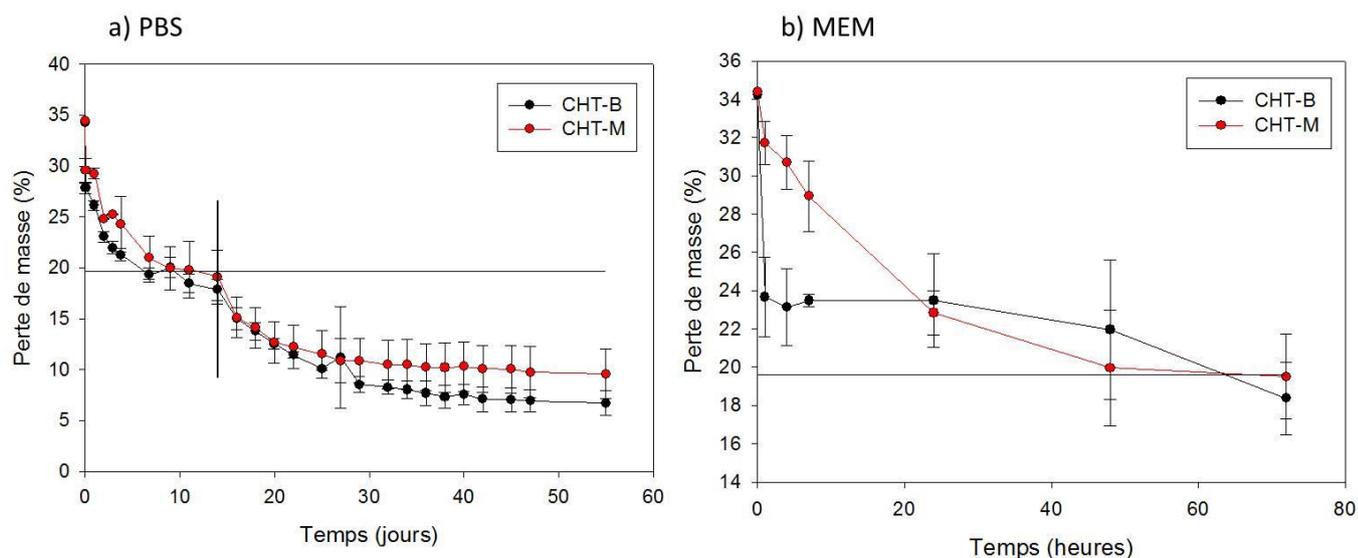


Figure 63 : Suivi de la dégradation d'échantillons (n=12) construits avec CHT-B et CHT-M (conditions C) dans a) PBS et b) MEM

Sur la Figure 63. a), on observe que les deux échantillons présentent un comportement similaire dans le PBS même si la dégradation est un peu plus lente pour le CHT-M. La dégradation est relativement rapide, et les multicouches adsorbées sont dégradées après 10 jours indépendamment de la nature du CHT. L'ensemble continue ensuite à se dégrader, atteignant ensuite un palier à partir de 35 jours.

Dans le milieu MEM, les profils sont assez différents selon le CHT utilisé pour la formation des multicouches. Comme montré précédemment, le CHT-B conduit à une brutale dégradation après 1h pour atteindre 10 % de perte des 15 % déposés par le procédé LbL, alors que ce taux de perte n'est atteint qu'après 24 h pour le CHT-M. Le phénomène est plus progressif au cours du temps, même si la dégradation des multicouches est complète après 72h pour les deux CHT.

Ces résultats montrent que l'augmentation de la longueur des chaînes du CHT n'a pas une influence déterminante sur la dégradation des assemblages. Cela pourrait suggérer que les couches de polyCTR- β CD pourraient constituer les points faibles des assemblages. Mises en présence de sel, les interactions ioniques intrinsèques des assemblages sont perturbées au profit d'interactions extrinsèques des PE avec les ions salins conduisant à la déstructuration des couches^{134,138}, et provoquant la dégradation continue des assemblages.

On pourrait envisager d'utiliser des CHT de masses molaires plus extrêmes pour distinguer une différence plus significative et confirmer les tendances observées.

II.3.4. Discussion à propos du profil de dégradation

Sur les différents profils de dégradations dans l'eau, le PBS et l'acide on observe une dégradation en deux temps, que les échantillons soient réticulés ou non, et quelque soit le CHT utilisé. Aux alentours de 10 jours, les profils (cf. Figure 60. a), b) c) et Figure 63. a)) présentent tous un changement visible sur les graphiques, comme schématisé Figure 64, excepté pour la dégradation en milieu acide, où la rupture est atteinte plus rapidement (8 jours).

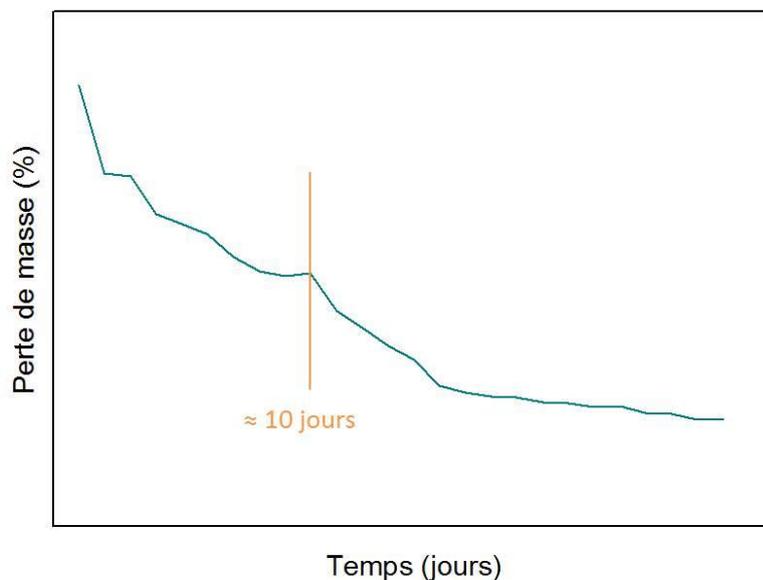


Figure 64 : Schématisation des profils de dégradation dans les différents milieux

Il a déjà été démontré, sur des films CHT/Hyaluronan, que la dégradation (enzymatique dans ce cas) ne s'effectuait pas linéairement, couche par couche, mais s'accompagnait de la formation de pores dans les films et que la dégradation progressive s'effectuait du bas vers le haut¹³⁶. Il est alors envisageable d'attribuer la première région à la dégradation de la 1^{ère} couche thermofixée, comme le suggèrent les résultats de dégradation obtenus en conditions acides. Puis, la dégradation se poursuit avec la déstructuration des polymères dans le film multicouches.

II.3.5. Conclusion

Ainsi, on a pu voir que l'environnement dans lequel est placé l'échantillon provoque une dégradation plus ou moins rapide et plus ou moins importante, en fonction de sa force ionique notamment (vitesse de dégradation = H₂O < Acide < PBS < MEM). Par ailleurs, la réticulation par la gépinine permet de ralentir plus ou moins efficacement la dégradation dans les différents milieux

étudiés. La masse molaire du CHT n'a pas, quant à elle, une grande influence sur la vitesse de dégradation du film LbL.

Dans le MEM, la dégradation s'étend seulement sur trois jours. On peut supposer une vitesse de dégradation du même ordre en milieu *in vivo*, ce qui peut sembler à priori rapide mais qu'il faut corréliser avec l'effet thérapeutique recherchée, puisqu'un pansement est changé tous les jours par exemple. Dans les milieux physiologiques, en jouant sur la masse molaire et la réticulation du CHT, il apparaît peu envisageable de moduler la vitesse de dégradation des assemblages.

III. Assemblages LbL incluant des principes actifs modèles (PAM)

III.1. Etude des complexes PAM / polyCD

Les PAM étudiés – Paracétamol (P), acide 4-tert-butyl benzoïque (TBBA) et Bleu de méthylène (BM) - forment des complexes d'inclusion avec la β CD native. Il s'agit, dans cette partie, d'étudier la complexation de ces molécules modèles avec le polyCTR- β CD par RMN et par UV.

III.1.1. RMN du proton 1D et 2D

Dans un premier temps, une étude par RMN a été réalisée afin de mettre en évidence la complexation du TBBA, du BM et du Paracétamol avec le polyCTR- β CD. Le rapport molaire 1:1 entre les PAM et les CD a été utilisé, excepté pour le TBBA puisque sa limite de solubilité n'autorise qu'un ratio 1:6 (dans une solution de polyCTR- β CD de 4 g/L). Seuls les spectres obtenus pour le BM sont présentés en Figure 65, les autres spectres sont donnés en ANNEXE 3.

Dans un premier temps, on peut calculer la composition massique du polyCTR- β CD en CD à partir du rapport des intégrations du signal des protons H_1 de la CD (à 5,01 ppm) et de celui des protons des groupes méthylènes des citrates (double massif à 2,76 et 2,93) ; sachant que la CD porte 7 protons H_1 et les citrates 4 protons (2 groupes CH_2). Ainsi le polyCTR- β CD utilisé comporte 50 % en poids de cyclodextrines.

Le spectre du complexe BM / polyCD montre un léger déplacement des protons H_3 et H_5 internes de la CD (cf. Tableau 18 et Figure 65.b)). Par contre, le déplacement des signaux des protons aromatiques du BM est nettement visible sur la Figure 65.c). Ceci révèle la formation d'un complexe d'inclusion entre le BM et le polyCTR- β CD. De même, en présence de TBBA ou de Paracétamol, le léger déplacement des protons internes est observé (cf. ANNEXE 3. 1 et ANNEXE 3. 2, respectivement), ainsi que les déplacements significatifs des protons aromatiques.

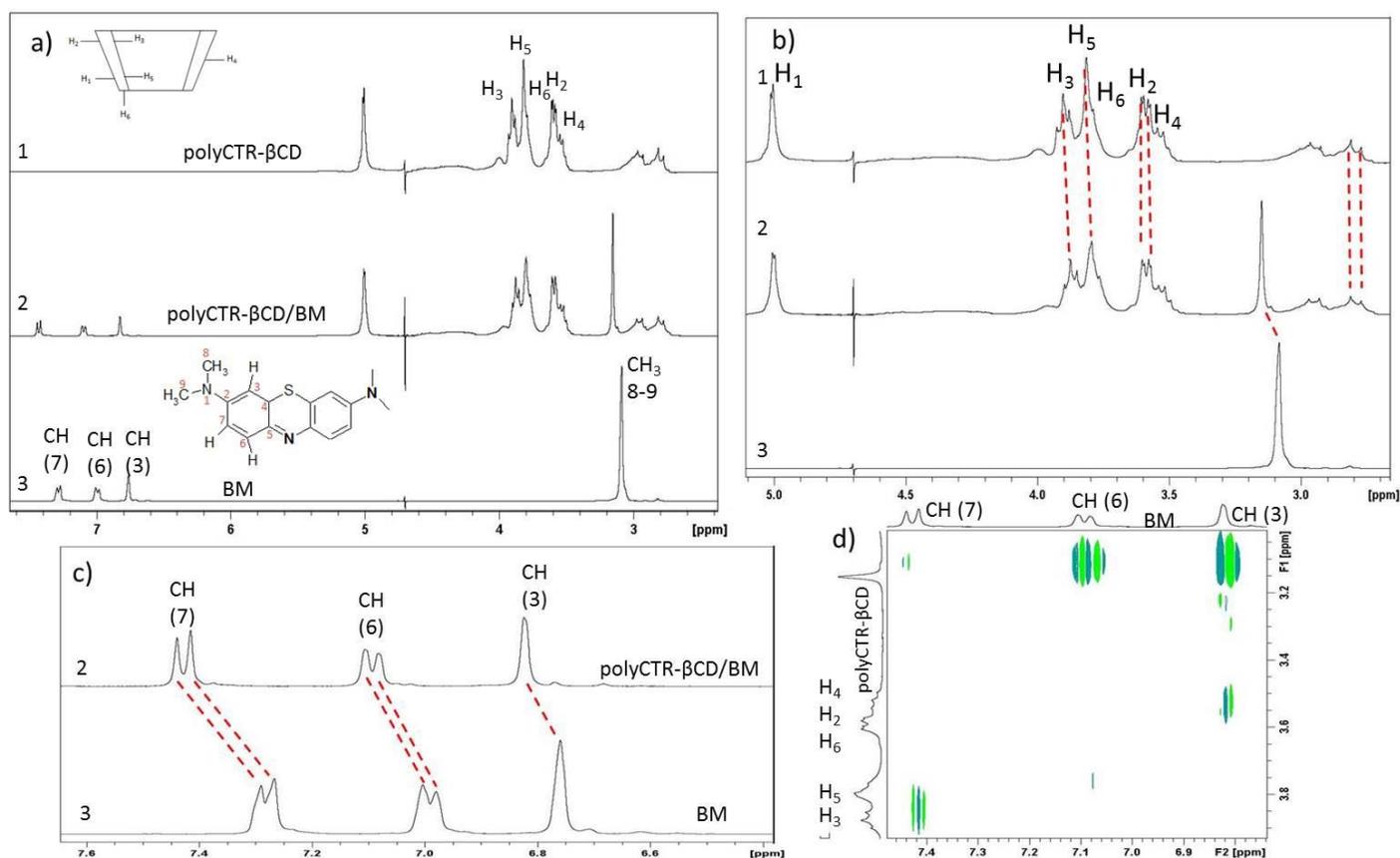


Figure 65 : Etude RMN du complexe BM / polyCTR-βCD (D₂O), 1) polyCTR-βCD, 2) Complexe polyCTR-βCD / BM, c) BM

Les résultats des déplacements significatifs pour les protons des CD lors de la formation d'un complexe PAM / polyCTR-βCD avec chacun des PAM étudiés sont regroupés dans le Tableau 18 suivant.

Tableau 18 : Déplacements chimiques des protons de la CD polymérisée (polyCTR-βCD) et leur variation dans les complexes avec TBBA, Paracétamol et BM

	H ₁	H ₃	H ₅	H ₂	H ₄	CH ₂ -CTR
δpolyCTR-βCD (ppm)	5,01	3,99	3,8	3,62	3,58	2,76 – 2,96
Δδ(ppm) TBBA	0	-0,04	-0,02	0	0	0
Δδ(ppm) Paracétamol	0	-0,19	-0,1	0	0	0
δppm BM	0	-0,1	-0,02	0	0	0

Les résultats des déplacements significatifs pour les protons des différents PAM lors de la formation d'un complexe PAM/polyCTR- β CD sont regroupés dans le Tableau 18 suivant.

Tableau 19: Déplacements chimiques des protons des trois PAM libres et variation de leur déplacement chimique sous leur forme complexée avec polyCTR- β CD

	TBBA			P			BM			
Type	CH ₃ : 6-	CH :	CH :	CH ₃ :	CH :	CH :	CH ₃ :	CH	CH :	CH
n° C	6'-6''	4-4'	3-3'	8	3-3'	2-2'	8-9	3	6	7
δ libre (ppm)	1,27	7,45- 7,52	7,77- 7,79	2,08	7,08	6,77	3,08	6,76	6,96- 7,01	7,27- 7,29
Δ complexe δ ppm	+0,11	-0,02	+0,12	+0,03	+0,11	0	-0,07	+0,05	+0,13	+0,15

Comme observé sur la Figure 65. d), le spectre obtenu à partir d'une séquence NOESY 2D prouve la complexation par la présence de la tâche de corrélation issue des interactions dipolaires entre les protons aromatiques du BM et les protons H₃, situés à l'intérieur des cavités des β CD (3,86 ppm). Ces résultats sont également observés pour les protons aromatiques de TBBA et du Paracétamol.

III.1.2. UV-visible

Dans un second temps, la constante de complexation des PAM et du polyCTR- β CD a été déterminée par spectrophotométrie UV-visible.

Le détail de l'étude n'est donné ici en Figure 66 que sur le BM, les résultats pour le TBBA et le Paracétamol sont donnés en ANNEXE 4 (1 et 2). La Figure 66. a) présente les spectres correspondant aux différentes solutions de BM (de concentration constante à 0,01 mmol/L) dans le polyCTR- β CD de concentration variable (comprise entre 1 mmol/L et 10 mmol/L).

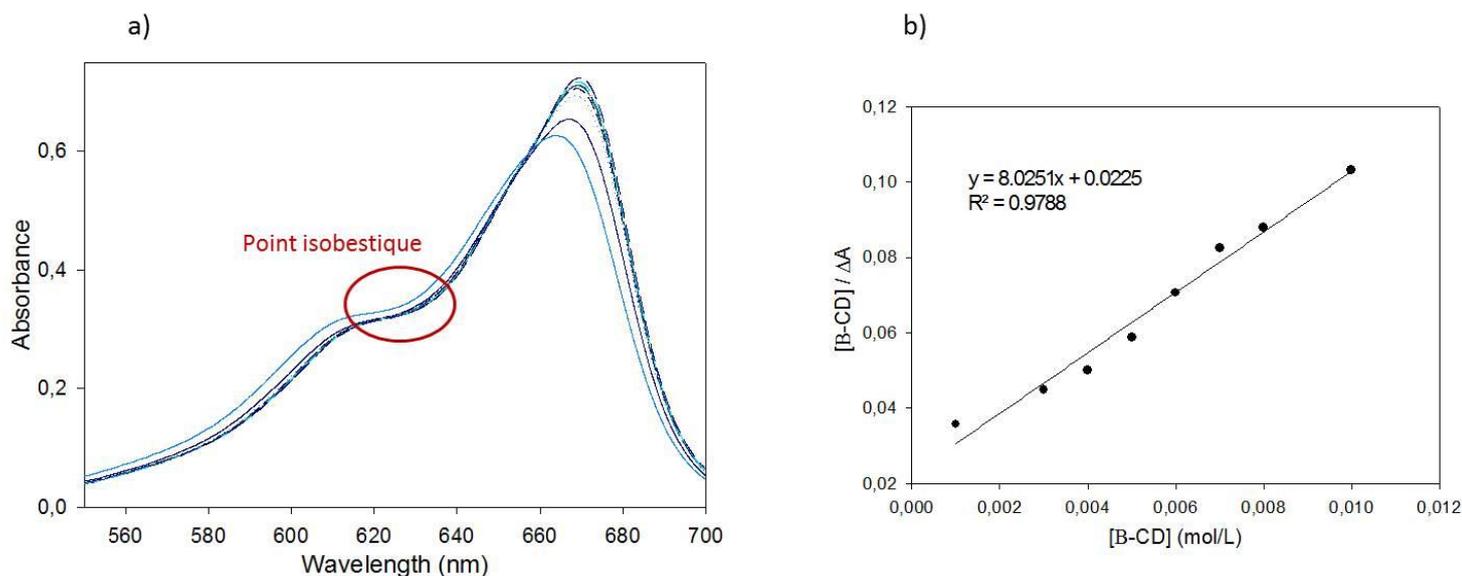


Figure 66 : a) Spectre UV-visible du BM (0,01 mmol/L) en présence de polyCTR- β CD variant de 1 à 10 mmol/L), b) Résultat obtenu par traitement de Benesi-Hildebrand

En augmentant graduellement la quantité de CD dans les solutions, on observe une augmentation de l'absorbance à 664 nm avec un effet bathochrome. La Figure 66.a) montre le point isobestique obtenu aux environs de 625 nm. L'équation de Benesi-Hildebrand²⁵⁹ (cf. Figure 66.b)), permet ensuite de remonter à la constante de complexation (cf. PARTIE II, VI.2.2).

Les différentes constantes déterminées sont regroupées dans le Tableau 20 suivant :

Tableau 20 : Constante de complexation des PAM étudiés obtenues par UV-vis ($[PAM] = 0,01$ mmol/L et $[polyCTR-\beta CD]$ variant de 1 à 10 mmol/L)

Molécule Modèle	K_a avec β CD (L/mol)	K_a avec polyCTR- β CD (L/mol)
	- Littérature -	- Expérimental -
TBBA	18 400 ²⁵⁰	245
Paracétamol	148 ²⁵²	60
Bleu de Méthylène	460 ²⁵⁵	356

On remarque que la constante d'association de PAM / polyCD est plus faible que celle de CD native / PAM. Le Paracétamol présente la plus faible constante d'association en accord avec la littérature. Par contre, le TBBA présente une constante d'association très élevée avec la β CD native, qui diminue très fortement pour le polyCD. En effet, cette molécule est chargée négativement, il y a

donc un phénomène de répulsion entre les groupements carboxylates du TBBA et ceux portés le polyCD. Pour le BM, colorant cationique, les interactions sont au contraire plutôt favorisées.

Selon la nature des molécules étudiées, ces tendances ne sont pas toujours vérifiées. En effet, certaines études par électrophorèse capillaire²⁷¹ et par RMN²⁷² ont déjà prouvé que les constantes d'association étaient plus importantes lorsque le polyCD est utilisé par rapport aux CD natives.

Ainsi, tous les PAM étudiés sont plus ou moins capables de s'inclure dans les cavités des cyclodextrines du polyCTR- β CD, et il devient envisageable de charger en PAM les couches anioniques des assemblages multicouche par l'intermédiaire de ces complexes.

III.2. Construction des assemblages avec les complexes PAM / polyCD

Lors de la construction d'assemblages multicouches avec un PAM, de nombreux paramètres peuvent influencer sur l'adsorption des différentes couches de polyélectrolytes, tels que la concentration en PAM, sa charge etc... Dans cette partie, nous allons étudier ces différents paramètres.

Dans les études suivantes, les multicouches sont construites selon la Voie 1 optimisée et décrite en Partie II (III.2), avec [CHT] = 5 g/L solubilisé dans AcOH 10 mL/L et [polyCTR- β CD] = 4 g/L solubilisé dans H₂O. Les ratios molaires PAM / polyCTR- β CD ont été calculés par rapport à la concentration en unités cyclodextrines présente en solution.

III.2.1. Etude par OWLS

Dans un premier temps, des études par OWLS ont été réalisées pour chacun des trois PAM testés. La construction des systèmes multicouches repose sur la différence de densité de charge des deux polyélectrolytes et les interactions ioniques qui en découlent. Aussi, l'introduction d'une molécule chargée ou non combinée à l'un des deux PE, peut perturber la construction de l'assemblage multicouches.

Le CHT-B est utilisé dans cette étude. Les écart-types n'apparaissent pas toujours sur les figures qui suivent afin de ne pas surcharger les graphiques. Ils représentent environ 10 % de la valeur.

III.2.1.a) Cas du complexe TBBA/polyCD

La Figure 67 suivante présente l'évolution, suivie par OWLS, de la masse du film LbL déposée sur la cellule au cours des constructions pour des essais réalisés à partir de CHT, de polyCD et du complexe TBBA / polyCD de ratio molaire 1:6.

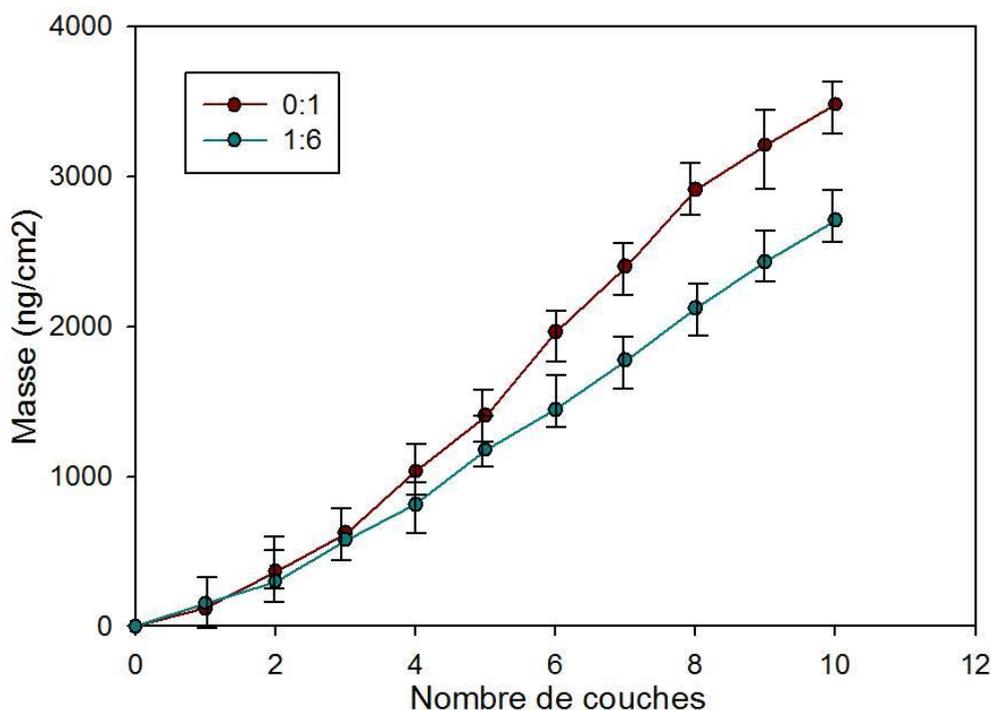


Figure 67 : Evolution suivie par OWLS du gain de masse cumulé à partir de complexe TBBA / polyCD de ratio molaires variables en fonction du nombre de couche (conditions C)

On peut constater, qu'au-delà de la troisième couche, le TBBA induit une perturbation sur la construction du système puisque les films à base de 10 couches ont des masses nettement inférieures à celles d'un système sans TBBA (2705 et 3480 ng/cm² respectivement). Cette différence peut s'expliquer par le fait que l'inclusion du TBBA dans les cavités des CD diminue le caractère hydrophile du polyCTR-βCD, ce qui a pour conséquence de diminuer les interactions avec la couche de CHT suivante, et ainsi de modifier la construction de tout l'assemblage. La perturbation est toutefois assez faible puisque le ratio TBBA / polyCD est faible (1:6).

III.2.1.b) Cas du complexe Paracétamol/polyCD

Comme le Paracétamol est très soluble dans l'eau, différentes concentrations ont été testées permettant d'aller d'un ratio Paracétamol / polyCTR- β CD de 1:4 à 4:1. Les résultats obtenus sont présentés Figure 68.

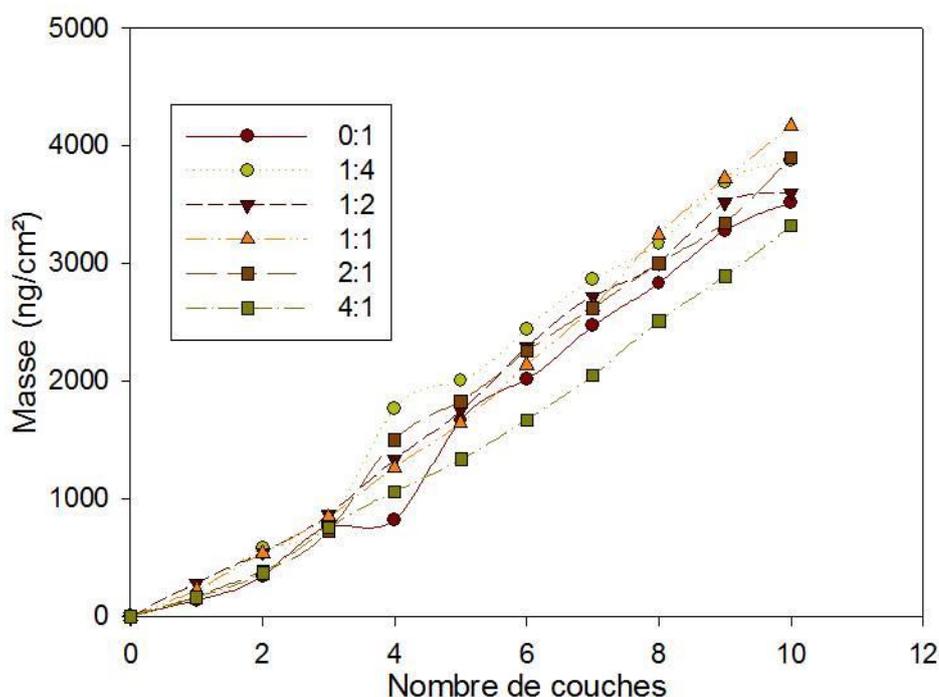


Figure 68: Evolution suivie par OWLS du gain de masse cumulé à partir de complexe P / polyCD de ratio molaires variables en fonction du nombre de couches (conditions C) - les écart-types représentent environ 10 % de la valeur donnée.

Dans ce cas, la construction des assemblages multicouches semble peu perturbée. En effet, quelle que soit la concentration en Paracétamol utilisée pour former le complexe d'inclusion, la construction se poursuit jusqu'à atteindre environ 3800 ng/cm² de molécules adsorbées.

Etant une molécule neutre, le Paracétamol induit donc très peu de perturbations dans la construction LbL. De plus, il est très soluble et forme un complexe d'inclusion moins stable avec le polyCTR- β CD (cf. III.1.2) que le TBBA par exemple. Il est donc possible que, lors des diverses étapes d'injections et de rinçages, il soit plus ou moins partiellement éliminé.

III.2.1.c) Cas du complexe BM/polyCD

Les résultats de l'étude réalisée avec le BM sont compilés Figure 69.

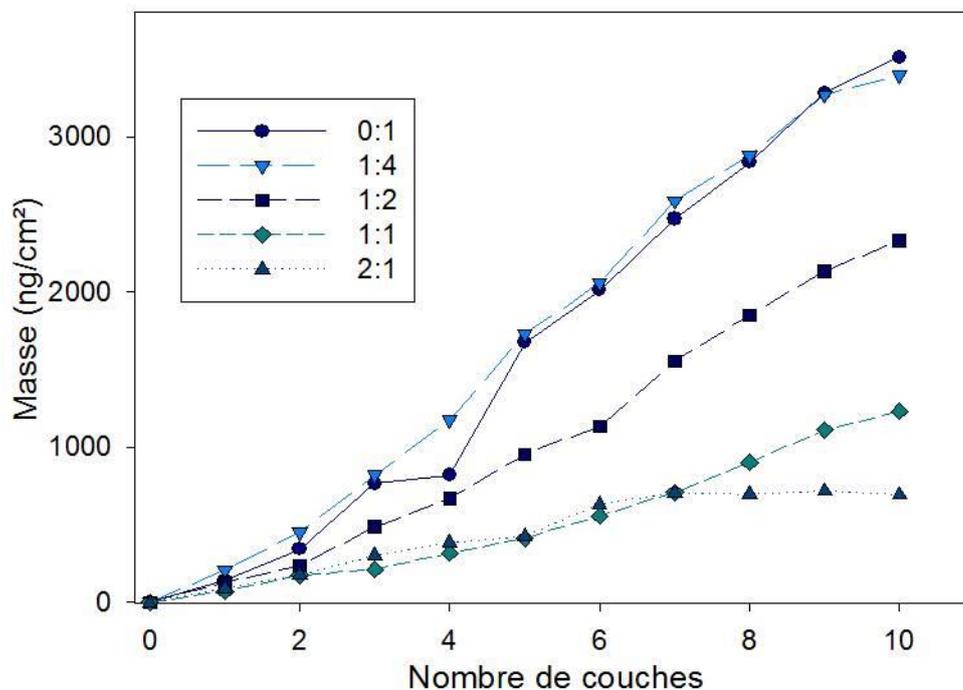


Figure 69: Evolution suivie par OWLS du gain de masse cumulé à partir de complexe BM / polyCD de ratio molaires variables en fonction du nombre de couche (conditions C) - les écart-types représentent environ 10 % de la valeur donnée.

En augmentant progressivement le ratio molaire BM/polyCD de 1:4 à 2:1, on voit d'abord un système peu perturbé (1:4) par rapport au système non chargé (3400 ng/cm² pour 10 couches) puisqu'il y a peu de cavités occupées. Ensuite, la densité du film LbL chute à 2300 ng/cm², 1200 ng/cm² et enfin 690 ng/cm² pour le ratio 2:1 (excès de BM). On peut supposer que les complexes BM / polyCD ont une densité de charge qui décroît avec un ratio molaire croissant. Ainsi le complexe ionique entre PE+ et PE- ne se forme plus dès la 7^{ème} couche dans le cas du ratio 2:1..

III.2.1.d) Synthèse des résultats en OWLS

Nous avons pu observer par OWLS que le suivi de la construction des assemblages multicouches utilisant le PE- chargé avec chacun des 3 PAM étudiés, est possible.

Toutefois, la construction LbL peut être plus ou moins perturbée en fonction de la molécule complexée, et du ratio molaire du complexe PAM / polyCD. Dans le cas du Paracétamol, l'influence du ratio PAM / polyCD n'est pas significative alors que c'est le cas pour le BM. De plus, à ratios comparables, le TBBA (1:6) perturbe plus la construction que le BM (1:4).

III.2.2. Elaboration de film LbL chargés de PAM sur textile

La construction par LbL avec le CHT-B est réalisée sur textile pour les 3 PAM étudiés selon la Voie 3 représentée sur le schéma récapitulatif donné en

Figure 41. La construction de ces assemblages multicouches est réalisée en utilisant un temps d'imprégnation plus long (30 min au lieu de 15 min) par rapport aux assemblages sans PAM. En effet, la littérature rapporte des exemples d'assemblages multicouches construits à partir de protéines¹⁵⁹ ou de virus²⁰², ou encore avec une molécule de Piroxicam complexée dans les cavités d'un polymère de cyclodextrines¹⁷⁸ et dont les temps d'imprégnation sont bien plus longs que ceux pour des polyélectrolytes non combinés à des agents actifs (jusqu'à 1 h au lieu de 5 min). Dans ce cas, une étude préliminaire a été réalisée afin de déterminer le temps d'imprégnation nécessaire à la couche anionique contenant les PAM.

Le temps minimal d'imprégnation a été fixé à 30 min, pour assurer l'adsorption de la couche PAM / polyCD sur la couche de CHT précédente. La Figure 70.a) représente l'évolution du gain de masse en fonction du nombre de couches de deux assemblages multicouches ($n = 12$) construits avec le TBBA complexé dans les cavités des CD ($[TBBA] = C_{max} = 50 \text{ mg/L}$), suivant deux temps d'imprégnation différents (30 min et 1h). Comme aucune différence n'est observée entre ces deux temps d'imprégnation, par défaut, pour la suite des études, le temps d'imprégnation sera donc fixé à 30 min pour les couches anioniques chargées.

Les Figure 70.a), b) et c) présentent les suivis par gravimétrie de la construction des assemblages multicouches à partir des complexes PAM / polyCD pour chacun des trois PAM étudiés, à différents ratio PAM / polyCD. Elles permettent de mettre en évidence une perturbation systématique de la construction dès qu'un complexe PAM / polyCD est introduit dans l'assemblage par rapport à ceux sans PAM, et ce quelque soit le ratio utilisé. On observe pour tous les PAM testés, une chute significative du gain de masse (-8% pour le TBBA, -12 % pour le Paracétamol et - 13 % pour le BM) indépendante du ratio testé pour la formation du film LbL. La construction est donc gênée par l'introduction d'un complexe, ce qui diminue les quantités de PE déposées lors de la construction du film. Par ailleurs, le gain de masse étant assez faible par couche, les quantités de PAM introduites à chaque étape sont également faibles, et la précision de la méthode par gravimétrie ne permet peut être pas d'apprécier correctement les variations du gain de poids en fonction de la quantité de PAM introduite.

Ces résultats permettent d'envisager d'utiliser le ratio le plus important afin de charger au maximum le système en PAM.

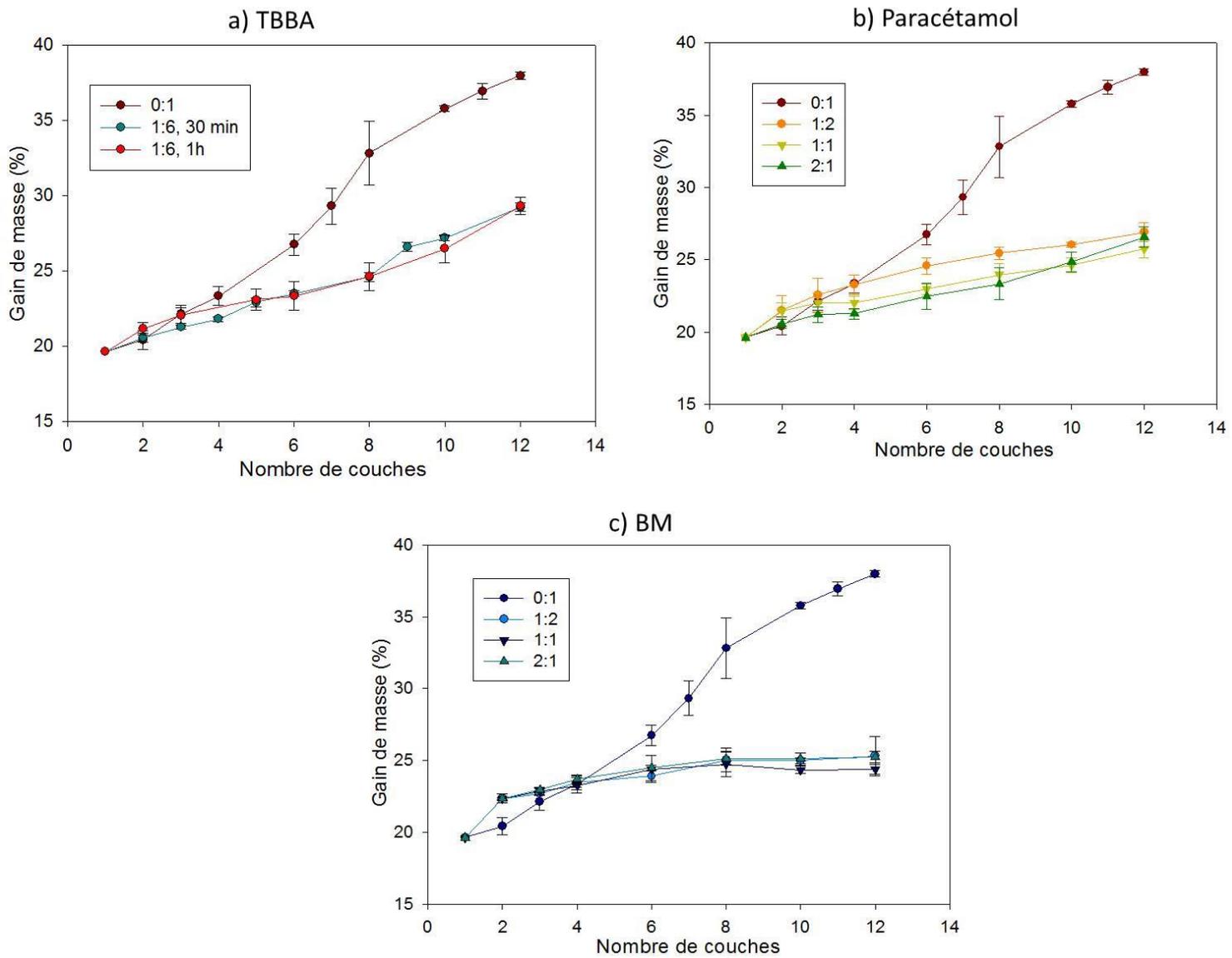


Figure 70 : Suivi par gravimétrie de la construction des assemblages multicouches à $n=12$ à partir de complexes PAM / polyCD de ratio molaires variables en fonction du nombre de couche (conditions C) pour a) TBBA, b) Paracétamol, c) BM

III.2.3. Synthèse et discussion

Afin de comparer les résultats obtenus par OWLS et sur textile pour chacun des PAM étudiés, les constructions avec un ratio PAM / polyCD de 1:1 pour la construction des différents assemblages ont été sélectionnées. Les résultats obtenus parallèlement en OWLS et sur textile sont présentés (cf. Figure 71).

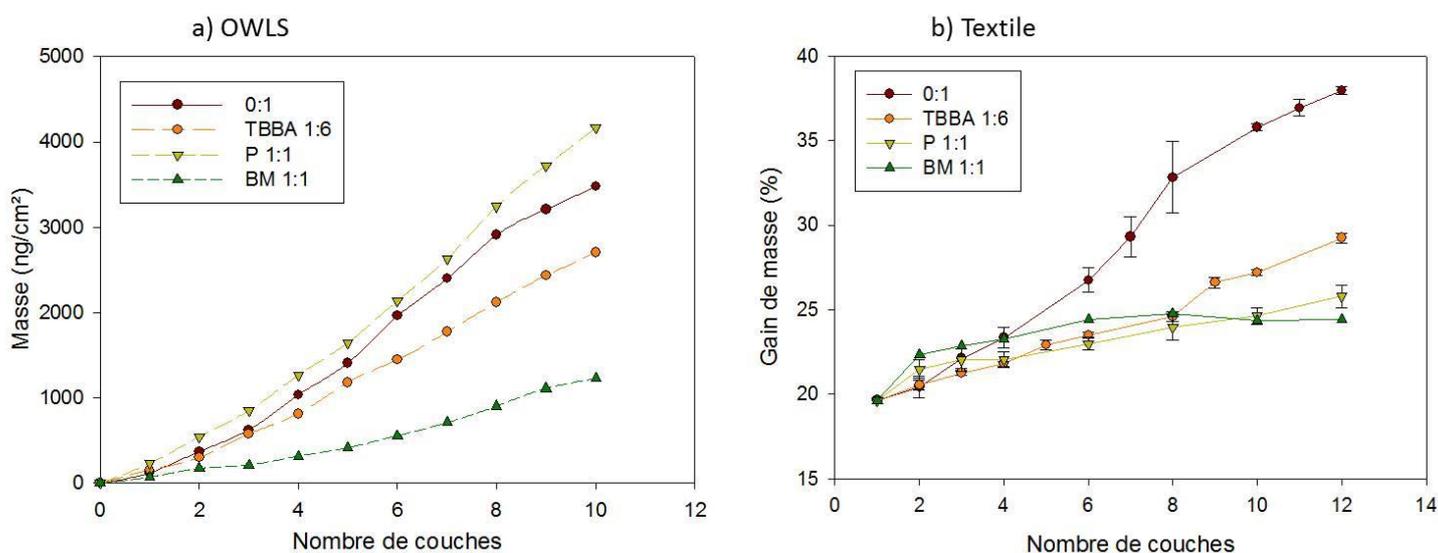


Figure 71 : Evolution du gain de masse cumulé en fonction du nombre de couches sur le support PET thermofixé avec les différents PAM étudiée par a) OWLS, b) Gravimétrie ; (Conditions C)

En fonction du PAM étudié, nous avons observé des phénomènes de gêne de la construction plus ou moins sensibles. De plus, l'ampleur de ces phénomènes varie selon la nature du support, cellule OWLS ou textile.

Par OWLS nous avons observé que les constructions LbL étaient relativement peu affectées lorsque l'on impliquait les complexes TBBA / polyCD (1:6) et Paracétamol / polyCD (1:4 à 4:1). A contrario, une perturbation importante est observée dès que le ratio BM / polyCD est supérieur à 1:2. Dans le cas de la construction LbL sur textile, l'utilisation des complexes PAM / polyCD provoque une gêne sensible de la construction LbL et ceci quels que soient les ratios molaires utilisés. Ceci démontre à nouveau que les phénomènes de transfert des PE depuis la solution vers la surface de la cellule OWLS d'une part, et vers celle du textile d'autre part, sont fondamentalement différentes.

Cette perturbation de la construction LbL avec les complexes PAM / polyCD peut s'expliquer par une modification de l'hydrophilie du complexe (cas du TBBA) par rapport au polyCD seul, ou de sa densité de charge (cas du BM). Dans ce dernier cas, le BM cationique peut interagir avec le polyCD via des liaisons ioniques et par complexe d'inclusion. Ce complexe aura par conséquent une affinité moins importante vis-à-vis de la couche de CHT suivante, qui elle-même interagira moins avec le complexe BM / polyCD de l'étape suivante etc... Ces interactions sont schématisées Figure 72.

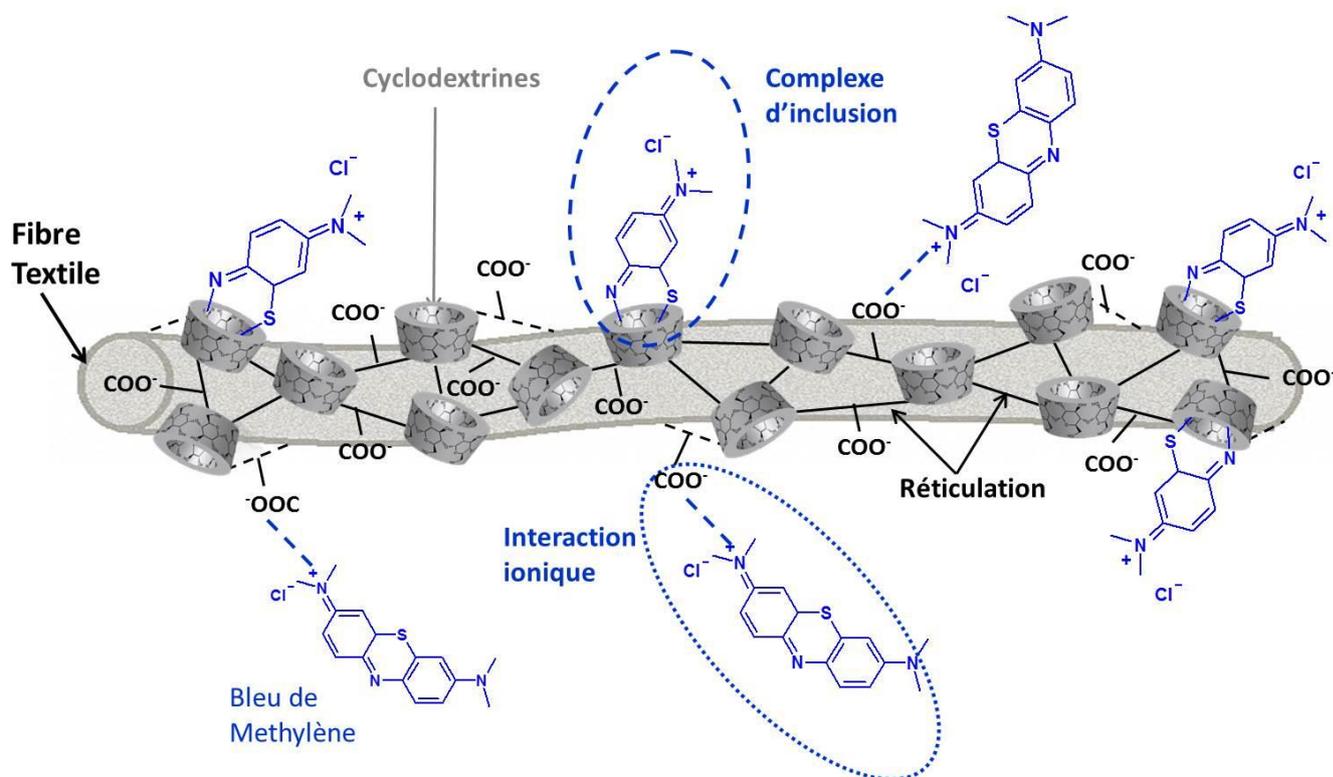


Figure 72: Schématisation des interactions entre BM et polyCTR-βCD : complexation d'inclusion et interactions ioniques

D'autre part et d'une manière générale, l'utilisation de ratios molaires croissants des complexes PAM / polyCD va modifier les propriétés et les caractéristiques du polyCD lui-même. Ceci est schématisé sur la Figure 73, où l'on suggère un taux d'occupation croissant des cavités et un taux d'implication des fonctions carboxylates dans des liaisons ioniques avec le PAM (cationique) qui vont modifier les propriétés chimiques du polyCD, lorsque le ratio molaire PAM / polyCD va croître.

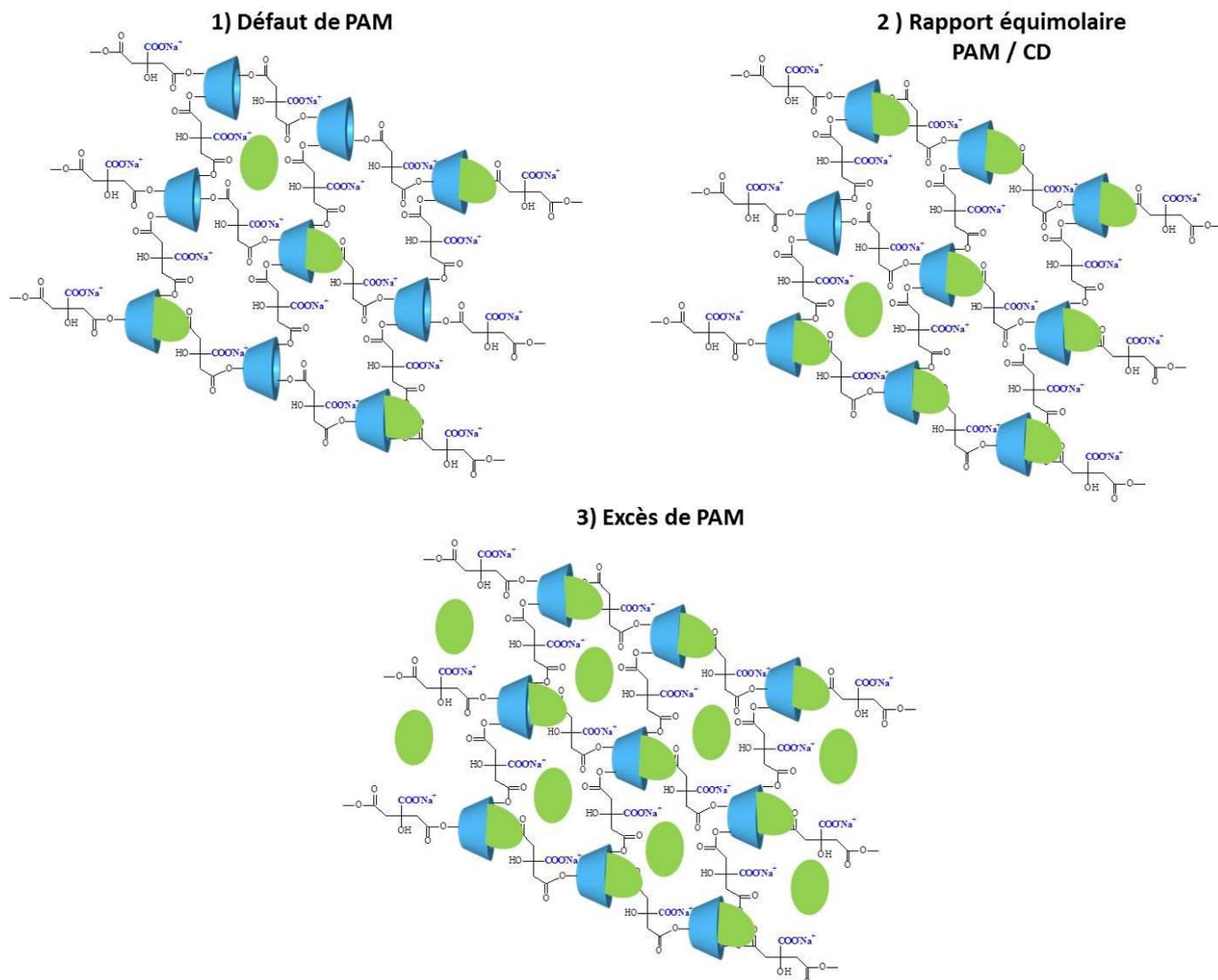


Figure 73 : Schématisation de l'influence du ratio PAM / polyCD sur les caractéristiques du polyCD

III.2.4. Influence de la masse molaire du CHT

L'étude comparative entre les deux CHT, CHT-b et CHT-M, a été réalisée pour des systèmes avec le BM comme PAM (ratio molaire 1:1 dans le complexe BM/polyCD) et les résultats obtenus par OWLS ainsi que sur textile jusqu'à 18 couches sont présentés (cf. Figure 74).

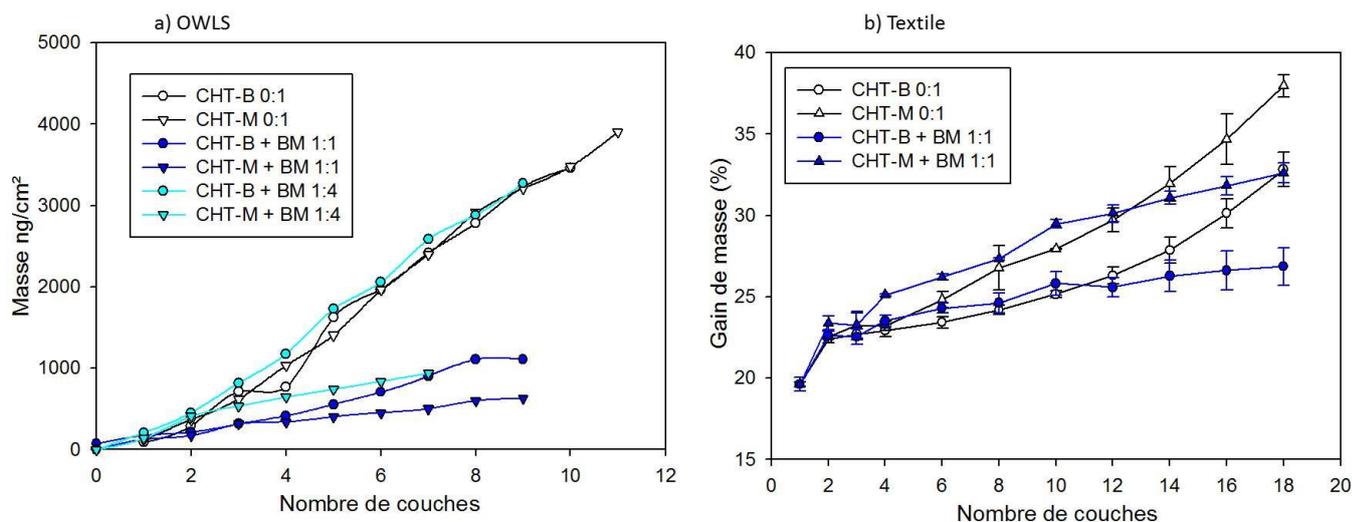


Figure 74 : Influence de la masse molaire du CHT sur la construction des assemblages multicouches (en termes de gain de masse cumulé) avec BM complexé (ratio BM/CD = 1:1, conditions C) ou non, étudiée par a) OWLS, b) Gravimétrie ;

Par OWLS et sur textile, on observe que l'utilisation d'un polyCD complexé avec le BM entraîne systématiquement une diminution de l'adsorption pour les deux CHT, ce qui se traduit par des gains de masse finaux plus faibles. Ces résultats sont en accord avec ceux démontrés plus haut (cf. parties III.2.1). Cependant, si les constructions sans BM ont le même comportement en OWLS, les assemblages construits présentent des profils différents en présence de BM. Pour un même ratio BM/CD, c'est toujours le CHT-B qui conduit aux dépôts les plus importants.

Il a été montré que l'insertion du BM dans les assemblages induisait une diminution de l'adsorption des couches puisque le recouvrement des couches BM / polyCD auto-assemblées sur le support par le CHT est moindre. Il est bien connu que la plupart des assemblages multicouches construits à partir de polysaccharides présentent une croissance en deux étapes, commençant par un régime linéaire (jusqu'à quelques couches) suivi d'une croissance exponentielle^{126, 174}. Ce régime exponentiel est permis par la diffusion de l'un des deux PE « dans » (« in ») et « hors » (« out ») du film multicouches à chaque étape^{125, 126}. Toutefois, la diffusion est majoritairement observée dans le cas de CHT de plus faible masse molaire ($1,1 \cdot 10^5$ g/mol)¹²⁵.

Comme vu précédemment, l'introduction du BM dans l'assemblage conduit à des perturbations dans la construction multicouches et des gains de masse plus faibles à chaque couche. Dans ce cas, on peut imaginer qu'il subsiste des espaces non recouverts par les PE, autorisant la diffusion des molécules de CHT-B qui ont de plus faibles longueurs de chaîne par rapport à celles de CHT-M ; ce qui permet de former des couches plus épaisses et donc d'obtenir des gains de masse plus importants avec le CHT-B (cf. Figure 75).

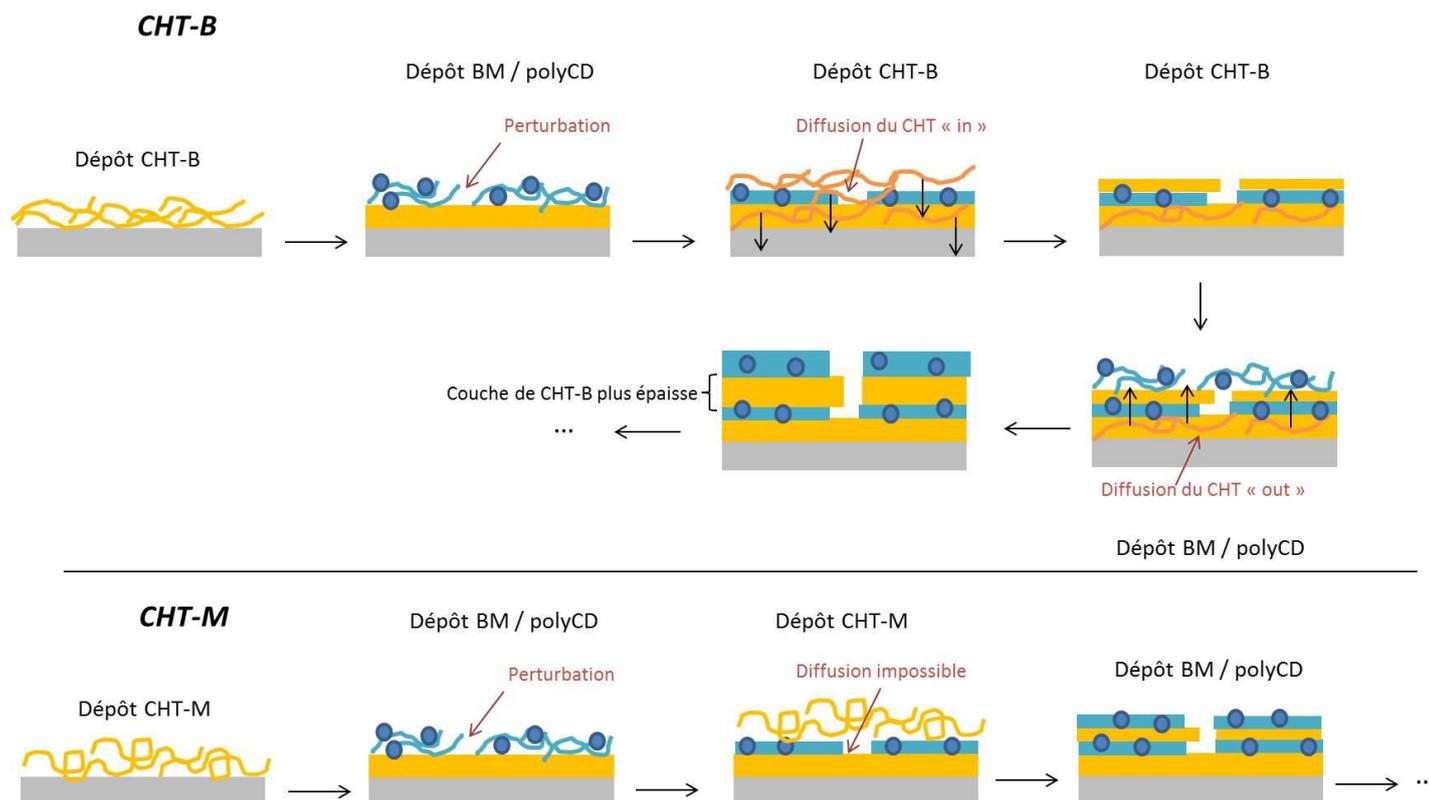


Figure 75 : Schématisation du dépôt multicouche suivi par OWLS à partir des CHT-B et CHT-M et du BM / polyCD

III.2.5. Implication de la couche thermofixée dans le système réservoir

Le rôle de la couche thermofixée a été jusqu'à présent, d'apporter une densité de fonctions carboxylates suffisantes pour adsorber par la suite la première couche de CHT par dip-coating. Or, cette couche thermofixée présente elle-même une capacité à interagir avec les PAM, non seulement via les cavités des CD, mais aussi via des interactions ioniques (cas du BM). Nous avons donc dans un premier temps imprégné cette couche thermofixée de BM puis l'assemblage multicouche a été réalisé avec le CHT-B et le complexe BM / polyCD (Voie D). Les résultats de la construction sur textile qui comparent les différentes voies de construction (A, C et D, cf. Figure 41) sont donnés en Figure 76.

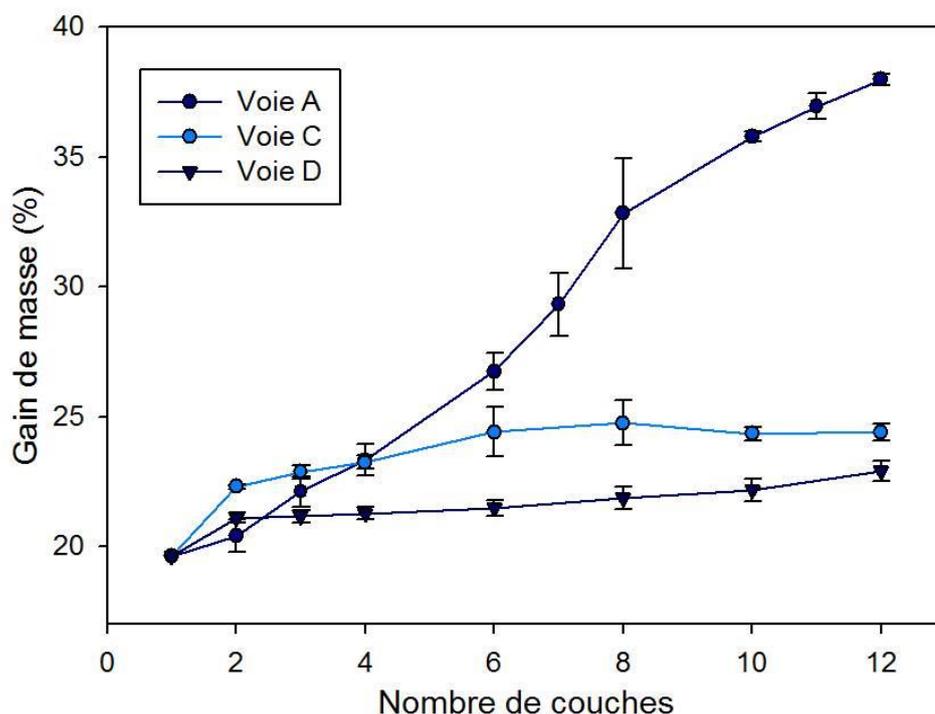


Figure 76 : Construction des assemblages multicouches sur textile selon les Voies 2+3 et 3, $n = 12$, ratio BM/CD = 1:1, conditions C

Après le dépôt de 12 couches sur le support textile, force est de constater que l'inclusion du BM dans la première couche thermofixée (Voie D) induit une petite perturbation dans le système au niveau de la 2nde couche par rapport au système où le BM n'est présent que dans les multicouches (Voie C).

Lors de l'étape de complexation avec les CD de la première couche thermofixée, le BM peut également interagir avec les charges négatives présentes, et en diminuer le nombre disponible pour l'adsorption de la couche de CHT suivante (cf. Figure 72). Ce qui conduit à un dépôt moins important de CHT sur la 2nde couche comme présenté en Figure 76, et induit des gains de masse moins importants pour toutes les couches suivantes.

III.3. Conclusion

Cette partie a mis en avant les différences observées selon les paramètres expérimentaux appliqués pour la construction des assemblages multicouches avec PAM.

Par OWLS, il a été noté que l'inclusion d'un PAM induisait une perturbation notable, sauf pour le Paracétamol. De plus, cette perturbation est variable selon le ratio molaire du complexe PAM / polyCD. Sur textile, tous les PAM induisent une forte réponse conduisant à des dépôts finals moins importants par rapport aux systèmes sans complexation de PAM. De plus, quelque soit le CHT utilisé (CHT-B ou CHT-M), la perturbation provoquée par le BM est toujours présente.

Ces phénomènes peuvent s'expliquer par l'influence de la charge des PAM, la diminution du caractère hydrophile du polyCD lors de la complexation, ainsi que les gênes stériques et autres écrantage des charges nécessaires pour former les interactions ioniques. Cependant, l'influence des ratios molaires dans le complexe PAM / polyCD n'a pas été détectée dans le cas du textile.

La première couche thermofixée a montré sa capacité à être utilisée comme un réservoir de PAM. Le système est toutefois plus difficile à construire, avec des gains de masse moins importants à chaque étape. En effet, le BM utilisé en excès, peut, à la fois, s'inclure dans les cavités des CD ou former des liaisons ioniques avec les groupements carboxylates présents en surface du textile.

IV. Etude de libération des PAM en batch

Le but de l'étude est d'élaborer des systèmes de libération prolongée de principes actifs et de les quantifier. Nous avons donc étudié la libération des PAM piégés dans les assemblages construits, en faisant varier la nature du milieu et le nombre de couches de l'assemblage. Encore une fois, plusieurs paramètres peuvent influencer cette libération et sont étudiés ci-après.

Les études de libération ont été réalisées dans l'eau pure, puisqu'il a été précédemment démontré que c'est dans ce milieu que les dégradations sont les plus longues. Ensuite, le PBS est utilisé pour se rapprocher des conditions physiologiques. Il a déjà été montré que les libérations dans le PBS ou le milieu MEM sont très similaires⁵², donc seules des libérations dans le PBS seront présentés ici.

IV.1. Influence du nombre de couches

On peut prévoir que la quantité de PAM chargée sur le textile, et sa cinétique de libération dépendra du nombre de couches du film LbL. Les résultats suivants (Figure 77) présentent les profils de libération des trois PAM (en mg de PAM/g de PET) dans l'eau, à 37 °C en fonction du nombre de couches déposées (Voie C). Pour la formation des complexes, les ratios molaires 1:1 ont été choisis, exceptés pour le TBBA (ratio 1:6).

L'influence du nombre de couches dans le film est très nettement mise en évidence pour les 3 PAM étudiés. Pour chaque PAM, la quantité chargée dans l'assemblage augmente lorsque le nombre de couches augmentent. Par ailleurs, on retrouve une hiérarchie dans les taux libérés de sorte que : BM > TBBA > Paracétamol avec des taux maximum respectifs de 15,4 mg BM / g textile, 2,09 mg TBBA / g textile et 0,45 mg P / g textile. Si la plus faible quantité de TBBA est justifiée par l'utilisation d'un ratio molaire TBBA / polyCD faible (1:6), le résultat très bas obtenu pour le Paracétamol est plus remarquable. Ces résultats peuvent être corrélés avec la faible constante d'association entre cette molécule et le polyCTR- β CD déterminée précédemment. Le complexe n'étant pas très stable en solution, il conduit à une élimination du Paracétamol lors des différentes étapes de la construction du film LbL.

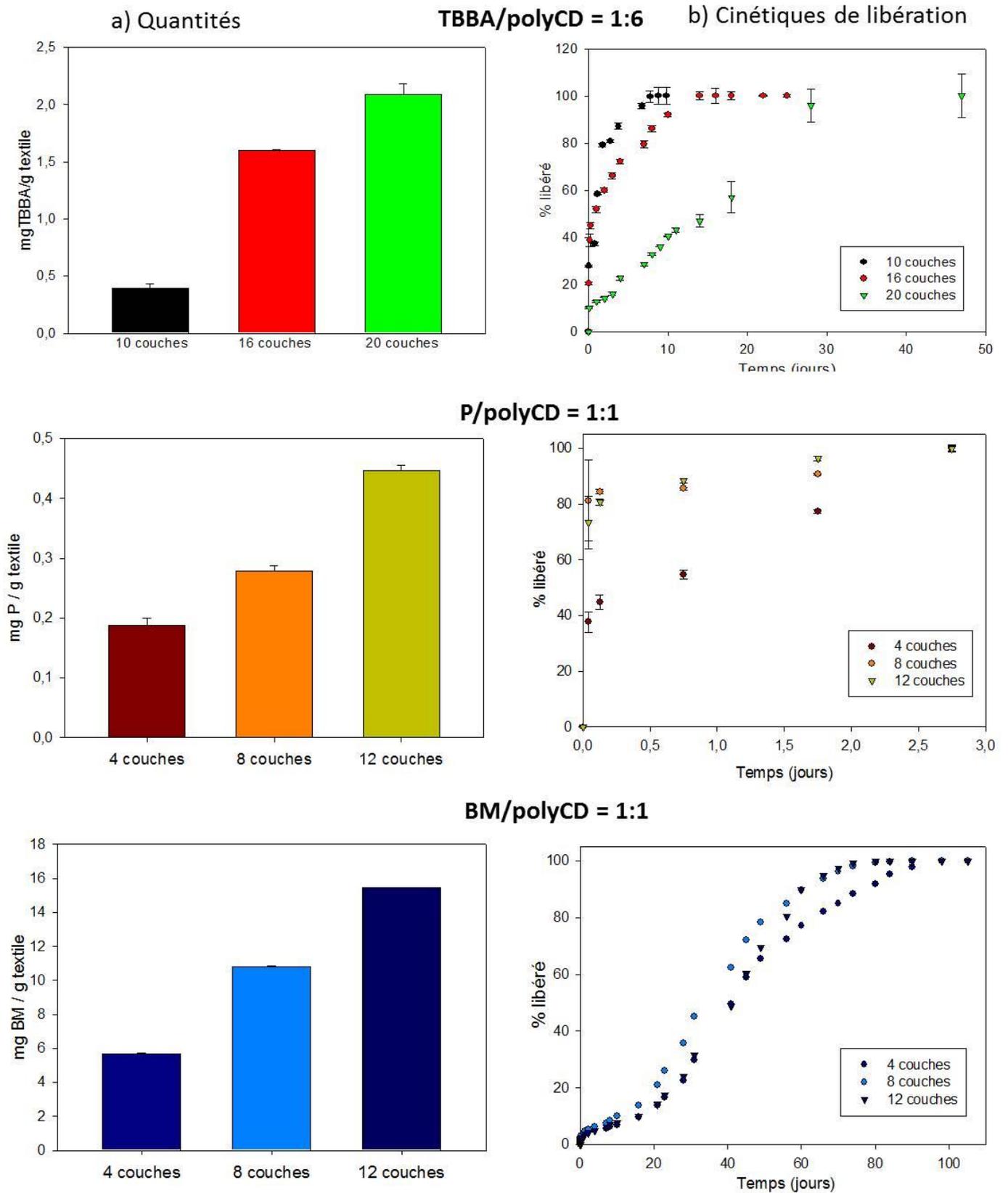


Figure 77 : a) Quantités totales libérées et b) cinétiques dans l'eau (37°C) en fonction du nombre de couche pour les trois PAM étudiés (ratio P/polyCD = ratio BM/polyCD = 1:1, et ratio TBBA/polyCD = 1:6, conditions C)

En ce qui concerne les cinétiques, on retrouve la même hiérarchie au niveau des vitesses de libération à savoir $BM > TBBA > \text{Paracétamol}$, avec des vitesses respectives de l'ordre de 80, 15 et 2 jours. Pour le TBBA le temps de libération totale varie avec le nombre de couches. Il augmente lorsque n augmente. Pour le Paracétamol la libération est très rapide pour $n = 8$ et $n = 12$ mais est ralentie pour $n = 4$. Pour le BM, on n'observe pas de grandes différences entre 4, 8 et 12 couches même si, de même que pour le Paracétamol, c'est l'assemblage $n = 4$ qui présente la libération la plus ralentie.

Une hypothèse pour expliquer les résultats obtenus pour le BM et le Paracétamol pour les assemblages $n = 4$ réside dans l'influence de la 1^{ère} couche thermofixée. En effet, lors de la construction des assemblages une certaine quantité de PAM peut diffuser au travers de l'assemblage pour se piéger dans les cavités des CD de la première couche thermofixée. Pour un assemblage à $n = 4$, il n'y a qu'une seule couche de CHT au-dessus de la couche auto-assemblée chargée en PAM, ce qui signifie qu'une partie de ce PAM piégé reste dans les cavités des CD autorisant une libération ralentie. Pour les assemblages à $n = 8$ et $n = 12$, le dépôt de toutes les couches supérieures entraîne la diffusion et l'élimination de ces molécules lors des étapes successives d'imprégnation / rinçages, et l'on observe uniquement la libération plus rapide du PAM piégé dans le film LbL.

Les quantités libérées en PAM ainsi que leurs cinétiques de libération sont donc dépendantes du nombre de couches du film LbL. La quantité en PAM augmente lorsque le nombre de couches augmente, et de même la cinétique de libération est modulée en fonction du nombre de couches déposées à la surface du textile.

IV.2. Influence des ratios molaires dans les complexes PAM/polyCD

Dans le paragraphe précédent, la libération des PAM a été étudiée en fonction du nombre de couches à la surface. Il s'agit maintenant de visualiser l'influence du ratio molaire du complexe PAM / polyCD pour des échantillons présentant un nombre de couches identique (construction selon la Voie C).

Les résultats suivants (cf. Figure 78) présentent les profils de libération dans l'eau, à 37 °C, de deux PAM (en mg de PAM par g de PET non traité) dans l'eau, à 37°C en fonction du ratio utilisé pour la formation du complexe. Des échantillons ont été construits avec trois ratios PAM/polyCD

différents ($n = 8$). Puisque le TBBA est très peu soluble, et que sa concentration maximale correspond à un ratio molaire TBBA/poly β CD de 1:6, l'étude n'a pas été réalisée sur cette molécule.

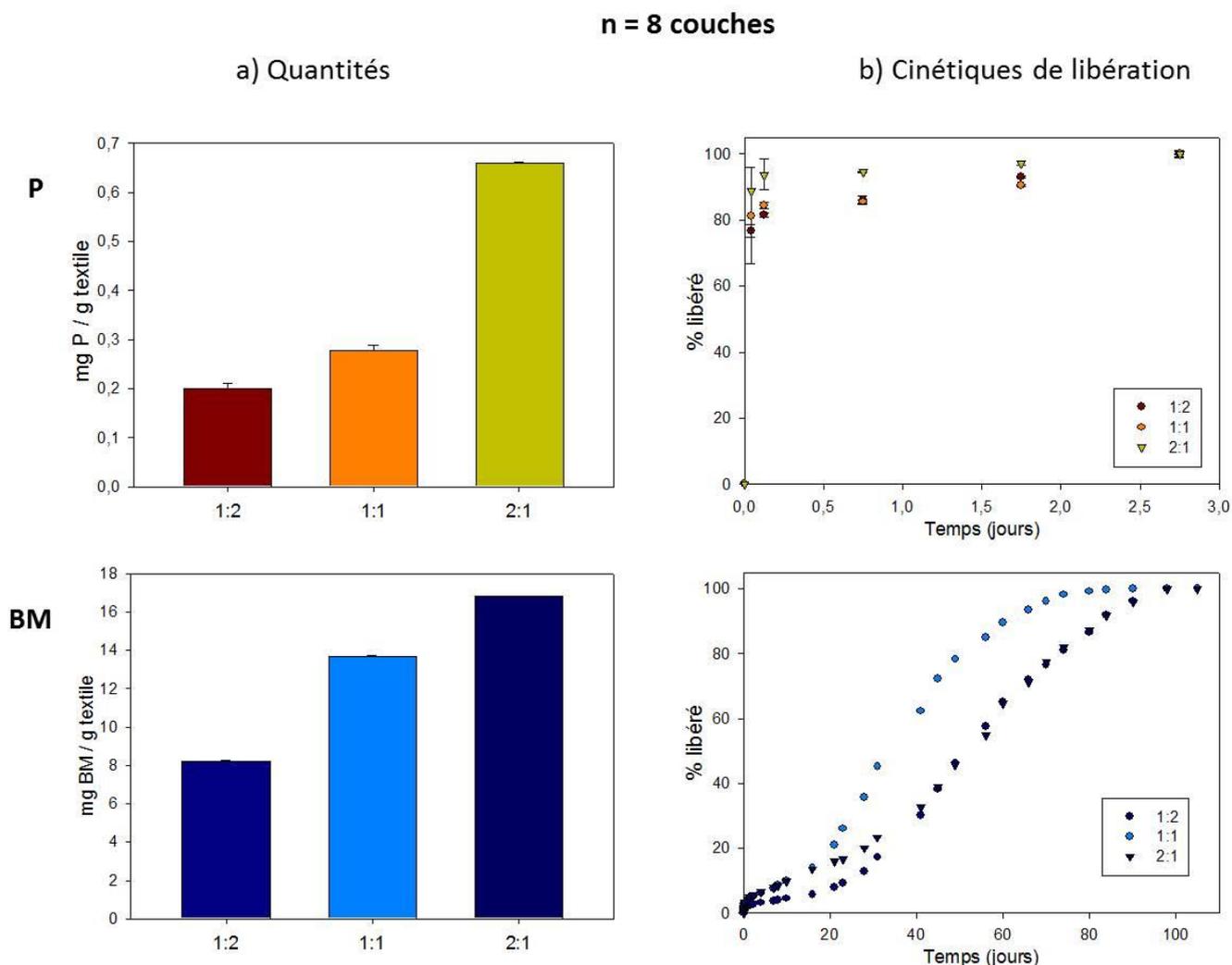


Figure 78 : a) Quantités totales libérées et b) cinétiques dans l'eau (37°C) pour des assemblages construits à partir de différents ratios PAM/polyCD ($n = 8$, conditions C)

Pour les deux PAM, on observe une évolution qui obéit au ratio utilisé pour la construction : les quantités libérées augmentent avec le ratio molaire utilisé pour former le complexe PAM / polyCD. Avec le BM, pour le ratio 1:2 il y a 8,2 mg de BM libéré en solution, et ce taux passe à 13,7 pour le ratio 1:1 puis à 16,8 mg BM / g textile pour le ratio 1:2.

Les cinétiques présentent des profils semblables pour les trois ratios Paracétamol / polyCD utilisés dans la construction du système LbL sur le textile mais les cinétiques de libération du BM diffèrent davantage. Les systèmes de ratios 1:2 et 2:1 ont le même comportement (palier atteint après 98 jours) alors que pour le dernier système (1:1), la libération est un peu plus rapide (palier après 80 jours).

La Figure 79 suivante présente des échantillons de PET vierge, et modifiés par un assemblage à $n = 8$ couches utilisant le BM / polyCD aux trois ratios testés, après 70 jours de libération. La coloration des échantillons après 70 jours de libération varie selon le ratio molaire BM / polyCD utilisé pour élaborer le film LbL sur le textile.

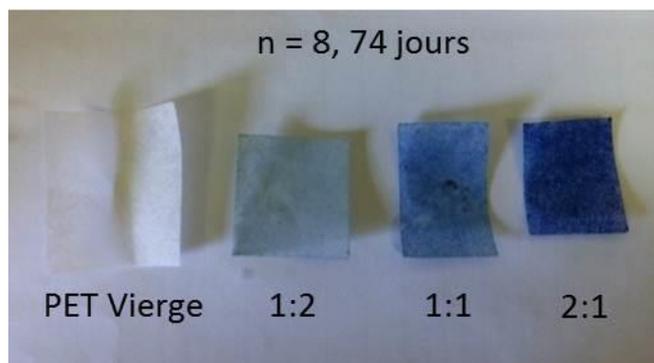


Figure 79 : Libération du BM en batch dans l'eau ($n = 8$, conditions C) après 74 jours pour les trois ratios BM/ β CD étudiés (1:2, 1:1 et 2:1)

Ces résultats montrent donc une réelle modulation de la libération dans l'eau possible, en fonction des ratios en PAM utilisés pour former le complexe PAM / polyCTR- β CD. En augmentant ce ratio, la vitesse de libération du BM est diminuée. Il est donc montré que même si un fort taux de PAM perturbe la construction des assemblages conduisant à des dépôts moins importants en OWLS (Figure 69), une augmentation de celui-ci permet tout de même de libérer des quantités plus importantes grâce aux PAM libres qui sont piégés dans le réseau des assemblages.

Cependant, si l'on se réfère à la partie **II.3 Stabilité des assemblages**, on remarque que les temps de libération ne sont pas vraiment en adéquation avec la dégradation des assemblages. En effet, dans l'eau, la dégradation des assemblages est très lente (au-delà de 70 jours). Cependant, les temps de libérations maximums pour le TBBA (38 jours) et pour le Paracétamol (3 jours) sont bien plus courts.

Une hypothèse pour expliquer ces résultats est la diffusion des PAM au travers des assemblages. En effet, au lieu d'être progressivement libéré par érosion successive des couches, les PAM seraient capables de diffuser à travers les couches. Cette hypothèse permet également de justifier les très faibles quantités libérées en solution sur des temps très court pour le paracétamol

par rapport au BM. Dans ce cas, de par la très grande solubilité du Paracétamol et sa faible complexation démontrée avec le polyCTR- β CD (cf. III.1), lors des adsorptions et rinçages successifs au cours de la construction des systèmes, les molécules diffusent rapidement et sont éliminées dans les rinçages conduisant à des taux très faibles libérés en solution. Le problème se pose alors moins pour des molécules moins solubles (le TBBA) ou permettant une meilleure complexation avec le polyCTR- β CD (le BM). L'étude suivante va permettre de vérifier cette hypothèse.

IV.3. Influence des couches supérieures sur la libération du PAM

Puisque le BM a montré les cinétiques de libération les plus longues dans l'eau, ainsi que les quantités libérées les plus importantes pour toutes les études précédentes, ce PAM a été choisi pour réaliser les expérimentations pour la suite des études.

Comme présenté ci-dessus, la libération des PAM en batch se fait sur des durées différentes de celles de la dégradation des assemblages. Il est donc supposé que ceux-ci diffusent au travers de ces mêmes assemblages plutôt que d'être libérés au fil de la dégradation du film LbL. Des études ont déjà montré ce type de phénomènes, en essayant de le réduire^{273,274}, en déposant par exemple une dernière couche en surface du film LbL à base de PLA ou de PLGA²⁰⁷, voire même en changeant la nature du PE au cours de la construction²⁷⁵, qui joueront un rôle de barrière afin d'empêcher cette diffusion. La réticulation pourrait également permettre un ralentissement de la libération : en densifiant le réseau polymère, la diffusion du PAM au travers de ce dernier pourrait être limitée.

Pour justifier cette hypothèse, un système de 8 couches dont la couche n°3 (polyCD) est composée du complexe BM / polyCTR- β CD (ratio 1:1) et où toutes les autres couches anioniques sont construites avec le polyCTR- β CD seul (cf. Figure 80, Système 6) est étudié. Ce système est ensuite comparé à un système (cf. Figure 80, Système 7) à 4 couches dont la seule couche anionique est composée du complexe BM / polyCTR- β CD (ratio 1:1). Tous ces systèmes sont construits selon la Voie C (cf. Figure 41).

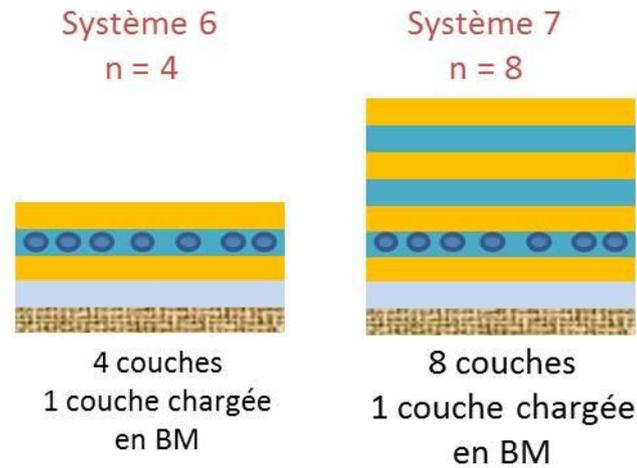


Figure 80 : Schématisation des 2 systèmes étudiés pour tester la diffusion du BM au travers des assemblages

La courbe suivante (cf. Figure 81) présente l'évolution de la libération au cours du temps de ces deux systèmes pour le BM.

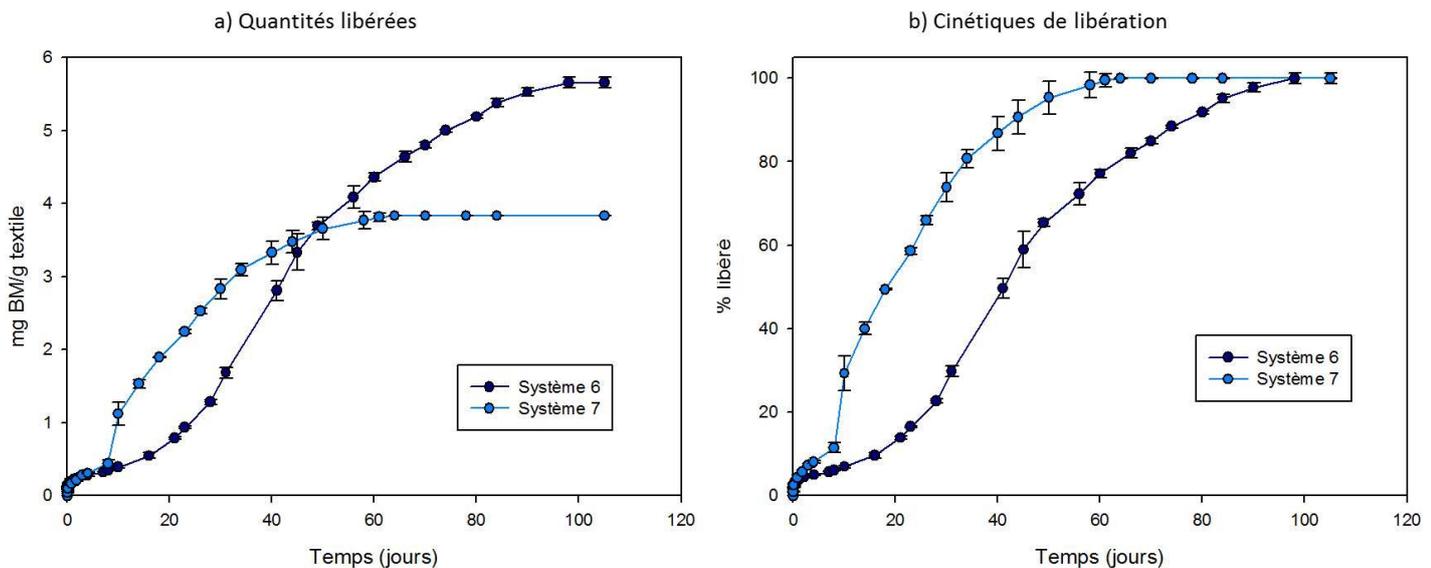


Figure 81 : a) Quantités totales libérées au cours du temps et b) cinétiques dans l'eau (37°C) pour les 2 systèmes étudiés (n = 8, conditions C, ratio BM/polyCD = 1:1)

Deux informations peuvent être retirées de ces figures. Tout d'abord, des différences apparaissent entre les deux profils de libérations des systèmes 6 et 7. Dans un premier temps, le système 7 libère le BM plus rapidement et le plateau est atteint à partir de 61 jours (cf. Figure 81.b)). On constate donc que l'assemblage multicouche construit par-dessus la couche n°3 ne gêne pas la libération. Ce résultat justifie l'hypothèse d'une libération du PAM par diffusion au travers des couches supérieures.

En second lieu, le système 7 libère moins de BM que le système 6 (3,83 mg BM / g textile contre 5,65 mg BM / g textile respectivement). En effet, lors de la construction de l'assemblage multicouche au-dessus de la couche n°3 chargée en BM, les solutions de rinçage se coloraient légèrement. Ce résultat indique la perte de BM au cours de la construction, par diffusion de celui-ci au travers des assemblages dans les solutions de rinçages, et donc des quantités en BM libérées moins importantes par rapport au système 6.

Ainsi, ces résultats confirment la libération des PAM par diffusion au travers des couches de PE supérieures des assemblages. Cela montre la nécessité d'introduire dans les cavités des CD du polymère, des molécules permettant une complexation assez stable en solution pour ne pas être éliminées lors des étapes de rinçage pendant la construction. Grâce à ce résultat, il est possible de justifier les hypothèses émises pour expliquer les faibles quantités libérées lors des études de libération sur le paracétamol.

IV.4. Influence de la masse molaire du CHT et de la réticulation par la génipine

Dans la partie II.3, il a été montré que la masse molaire du CHT et la réticulation des assemblages peuvent avoir une certaine influence sur leur vitesse de dégradation. Ces paramètres sont donc susceptibles d'influencer la libération du BM en solution. En effet, puisque l'on sait désormais que les PAM diffusent au travers des assemblages, une augmentation de la densité du réseau polymère par la formation d'un réseau réticulé pourrait permettre d'ajouter un effet barrière à cette diffusion et ainsi, ralentir le phénomène. On trouve plusieurs exemples dans la littérature où la réticulation permet de ralentir la dégradation des assemblages ou de prolonger une libération de principe actif pour des applications biomatériaux^{136, 141-145}.

IV.4.1. Influence de la masse molaire du CHT

Une première étude de libération dans l'eau sur des assemblages construits selon la voie C (cf. Figure 41) en présence de BM au ratio 1:1, avec du CHT B et du CHT M sans réticulation a été réalisée dans l'eau (n = 12, Voie C). Ces résultats sont présentés en Figure 82.

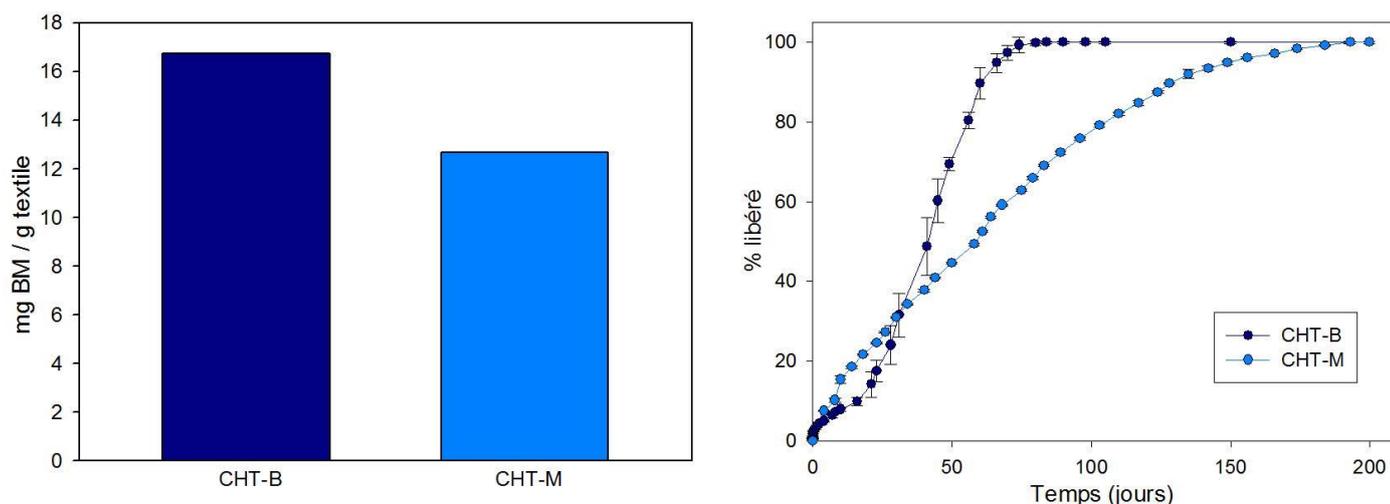


Figure 82 : A gauche, quantités totales de BM libérés et à droite, cinétiques de libération dans l'eau (à 37°C) pour des assemblages construits avec les 2 CHT ($n = 12$, conditions C) étudiés

On observe que l'assemblage construit à partir du CHT-M conduit à une quantité totale libérée de BM en solution moins importante que celui élaboré à partir de CHT-B (12,7 et 16,7 mg BM / g textile, soit une différence de 24 %). Cette différence trouve son explication lors de la construction du film LbL. En effet, dans la partie précédente, il a été montré que des plus hauts gains de masse sont obtenus sur textile lorsque les systèmes sont construits avec le CHT-M (cf. Figure 74. gauche). Cependant, la conformation « en boucle » du polymère déposé gêne la déposition de la couche anionique suivante formée du complexe BM/polyCD et affecterait la construction de l'assemblage. En effet, la pesée à chaque étape de la construction des assemblages a montré un gain de masse global moyen pour les couches anioniques plus élevé lorsque les assemblages étaient construits avec le CHT-B (4,1 %) par rapport au CHT-M (3,4%). Ce qui signifie que, comme schématisé en Figure 83, même si le gain de masse est globalement plus important pour les constructions LbL avec le CHT M, moins de complexe BM/polyCTR- β CD est intégré au film, ce qui conduit à un chargement en BM inférieur.

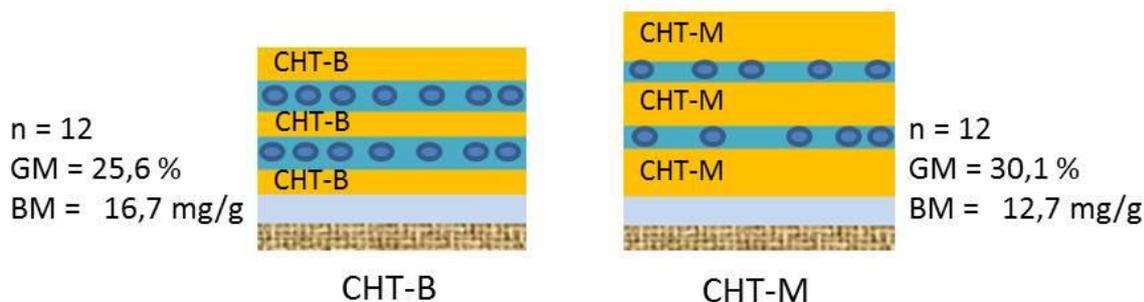


Figure 83 : Schématisation des dépôts obtenus lors de la construction d'assemblages multicouches ($n = 6$) avec les CHT-B et CHT-M (échelle non respectée)

Les profils de libération dans l'eau (cf. Figure 82. droite) sont complètement différents. Ceci est en accord avec le modèle proposé dans la Figure 83, qui représente la différence d'épaisseur existant entre les couches de CHT-B et de CHT-M dans leurs assemblages LbL respectifs. On peut supposer que la diffusion du BM au travers de l'assemblage LbL serait dépendante de l'épaisseur des couches de CHT, donc plus rapide dans le cas du film LbL à base de CHT-B que dans celui qui est à base de CHT-M dont les couches sont plus épaisses.

IV.4.2. Influence de la réticulation par la génipine

L'étude de libération a été menée dans le PBS, milieu dans lequel la dégradation de l'assemblage LbL est plus rapide, en combinant les résultats obtenus avec les deux CHT et en réticulant les assemblages par la génipine (solution à 0,05 %). Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous (cf. Figure 84).

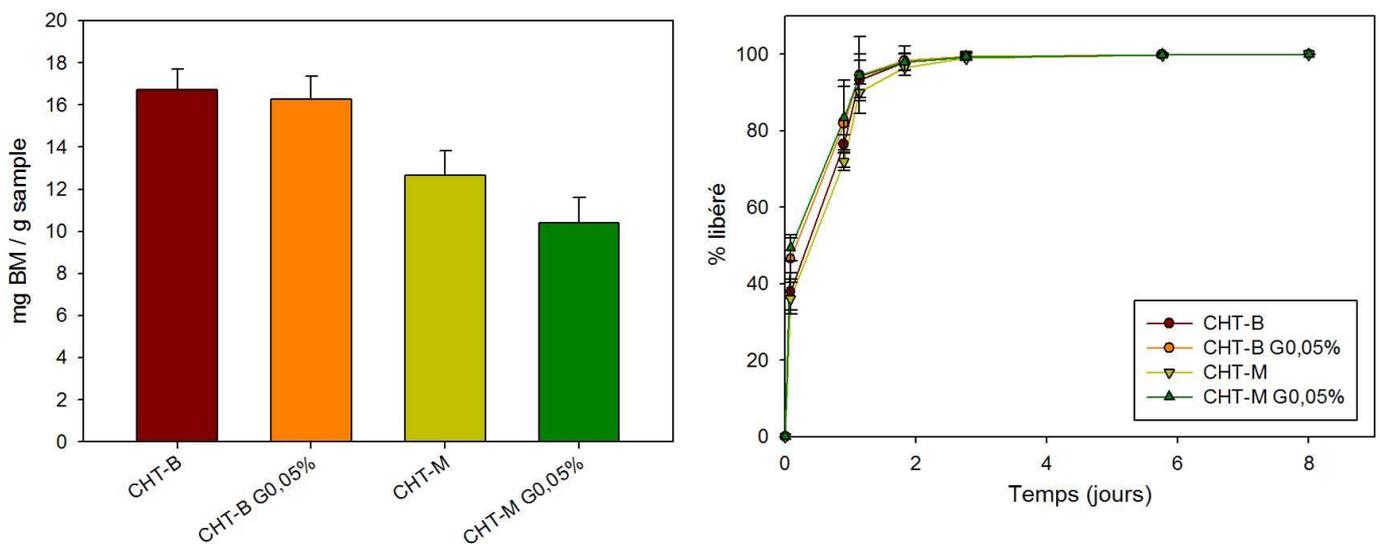


Figure 84 : a) Quantités totales de BM libérées et b) cinétiques de libération dans le PBS pour des assemblages construits avec les 2 CHT étudiés ($n = 12$, conditions C, ratio BM/polyCD = 1:1), réticulés par la génipine ou non

On trouve une analogie avec les résultats précédents selon lesquels les assemblages construits avec le CHT-M conduiraient systématiquement à des quantités totales libérées en BM moins importantes (16 contre 13 mg BM / g de textile).

Par ailleurs, une légère diminution des quantités libérées pour les échantillons réticulés est également visible (-3 % et -18 % pour les CHT-B et CHT-M respectivement). Pendant le processus de réticulation, les échantillons sont imprégnés dans une solution de génipine puis lavés ce qui peut conduire à une libération préliminaire incontrôlée de BM lors de ces étapes.

Concernant les cinétiques de libération (cf. Figure 84, droite), tous les échantillons ont le même comportement dans le PBS et le plateau de libération est atteint après 3 jours, ce qui est bien plus rapide que dans l'eau. Ces résultats sont en corrélation avec les études précédentes de stabilité qui ont montré qu'après 3 jours, une grande partie des assemblages multicouches était dégradée, sans effet barrière induit par le CHT ou la réticulation. Dans ce milieu, la libération s'accomplit au fil de la dégradation des assemblages.

IV.4.3. Conclusion

Ainsi, dans l'eau où les phénomènes de diffusion du BM à travers les couches du film LbL et la dégradation de ce dernier sont très lents, en augmentant la masse molaire du CHT utilisé pour la construction des assemblages, il est possible de moduler la vitesse de libération du BM. Toutefois, les quantités en PAM adsorbées puis libérées seront inférieures par rapport aux systèmes utilisant le CHT-B (- 24 %), car les gains de masse des couches anioniques à chaque étape seront plus faibles.

Par contre, dans le PBS nous n'avons pu observer ni l'incidence de la masse molaire du CHT sur la cinétique de libération ni celle de la réticulation du film LbL par la génipine. Ces conditions s'avèrent très destructrices vis-à-vis de l'assemblage LbL quelque soit sa composition (CHT-B, CHT-M, réticulation par la génipine). C'est pourquoi, l'influence de la première couche thermofixée a également été testée. Cette première couche, qui peut agir comme un réservoir de molécules pourrait également permettre de libérer du BM à plus ou moins long terme, une fois que l'assemblage multicouche est dégradé.

IV.5. Implication de la couche thermofixée dans le système réservoir

Il a été montré précédemment (cf. III.2.5) que la construction des assemblages utilisant les propriétés réservoirs de la 1^{ère} couche thermofixée était possible même si les gains de masse finals des dépôts LbL étaient moins importants. Cette première couche présente un gain de masse de 19,6 %-wt, et correspond donc à une proportion importante du matériau final. Elle possède de plus un potentiel non négligeable d'adsorption de PAM grâce aux cavités des CD présentes.

La Figure 85 représente les deux systèmes étudiés ($n = 12$, ratios BM/CD = 1:1), construits à partir des Voies C et D pour la complexation du BM (cf. Figure 41)). Dans un premier temps, il s'agit

de n'utiliser que les multicouches auto-assemblées comme réservoir de BM (Système 2, voie C). Puis, la couche thermofixée est utilisée comme réservoir (Système 4, voie D).

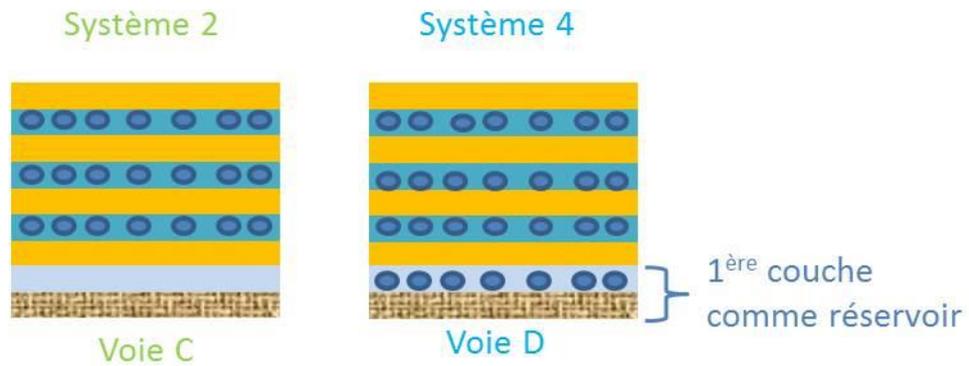


Figure 85 : Différents systèmes réalisés pour l'étude de l'influence de la 1^{ère} couche thermofixée, $n=12$, ratios BM/CD = 1:1

Les études des cinétiques de libérations du BM ont été menées dans l'eau et dans le PBS et les résultats sont représentés en Figure 86.

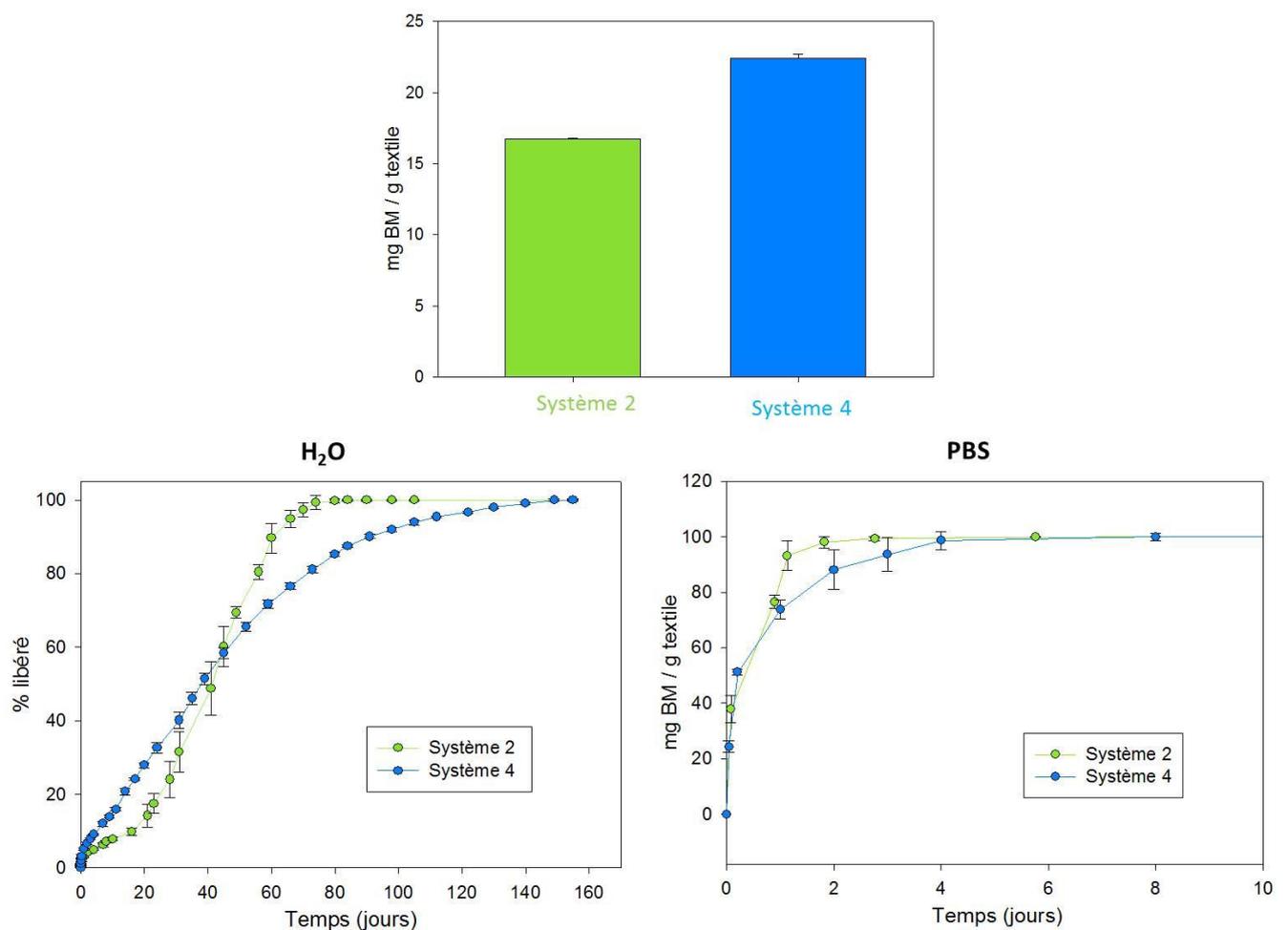


Figure 86 : Quantités totales de BM libérés (haut) et cinétiques de libération (bas) dans l'eau et dans le PBS à 37°C pour les deux systèmes (n = 12, ratio BM/CD = 1:1, conditions C)

On constate que le système 4 permet le piégeage puis la libération d'une quantité plus importante de BM, comparé au système 2 (23,5 et 15,4 mg BM / g textile respectivement). Ce résultat n'est, pas vraiment surprenant puisque grâce à la thermofixation, le dépôt de polymère pour la 1^{ère} couche atteint 19,6 % massique, permettant ainsi la complexation d'une quantité importante de BM au sein de cette couche.

En ce qui concerne les cinétiques de libération, des comportements assez différents sont observés. Le système 2 est celui qui libère le BM le plus rapidement dans l'eau et le PBS. En effet, comme déjà vu, le palier est atteint au bout de 84 jours dans l'eau et encore plus rapidement, au bout de 3 jours, dans le PBS. Dans l'eau, le système 4 permet de ralentir cette libération de plus de 50 jours puisque le palier est atteint au bout de 130 jours. Dans le PBS, la déstructuration rapide des multicouches conduit tout de même à une cinétique rapide pour le système 4, mais celle-ci est tout de même retardée puisque dans ce cas, la totalité du BM est libérée après 4 jours au lieu de 2 pour le système 2.

La Voie D pour former le système 4 apparaît alors comme une bonne solution pour augmenter les quantités de PAM chargées par le système puis libérées mais aussi pour prolonger la libération.

IV.6. Post-imprégnation du système LbL par BM

Puisque les molécules de BM diffusent au travers du matériau vers le milieu on peut imaginer le phénomène inverse, et il est donc possible de réaliser une post-imprégnation des assemblages par le BM. Dans un premier temps, le film LbL est construit selon le procédé classique sans BM (Voie A, système 1), puis le textile est imprégné dans une solution de BM. Ensuite, la libération du BM en batch a été effectuée dans l'eau. Ce système post-imprégné (Voie B, Système 5) a été comparé aux systèmes « classique » qui ont été construit par dip-coating à partir des solutions de CHT-B et du complexe BM / polyCD (Système 2 et 4).

IV.6.1. Comparaison des Voies B, C et D

Les systèmes 2, 4 et 5 (cf. Figure 41) permettent tous de piéger des PAM dans les assemblages multicouches, en utilisant deux techniques différentes. La première (Voie C et Voie D), qui est celle utilisée depuis le début de la présentation des résultats, utilise le complexe PAM / polyCD en solution pour former des couches anioniques. La seconde, la Voie B, est basée sur un

principe de diffusion des molécules de PAM au travers de l'assemblage, une fois celui-ci construit. Pour cette Voie B, la concentration de la solution de BM utilisée est la même que celle utilisée pour former un ratio BM/CD de 1:1. De fait, on compare les deux systèmes à conditions équivalentes.

Toutefois, ces deux techniques présentent chacune différents avantages et inconvénients qui sont regroupés dans le Tableau 21 suivant.

Tableau 21 : Avantages et inconvénients comparés des Voies B et C pour le piégeage des PAM dans les assemblages

	Avantages	Inconvénients
Voie B (Système 5)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Simple et rapide à réaliser ✓ Temps d'adsorption court pour chaque couche (15 min) ✓ Possibilité d'inclure les molécules au dernier moment 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Impossibilité d'introduire 2 molécules non compatibles entre elles ✓ Début de l'érosion des assemblages pendant la phase de mise en contact
Voie C & D (Système 2 & 4)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Utiliser différents polymères de CD (pour jouer sur le diamètre des cavités) ✓ Possibilité de complexer différentes molécules dans un même assemblage ✓ Augmentation de la solubilité des PAM par complexation 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Temps d'adsorption long pour les couches anioniques (30 min) ✓ Perte possible par diffusion des PAM pendant la phase de construction

Avec les systèmes 2 et 4, il est possible d'agrandir ou de diminuer le diamètre des cavités disponibles d'une couche à l'autre pour permettre un panel très large de molécules utilisables en jouant sur le polyCTR-CD utilisé (α , β ou γ CD). De plus, la formation du complexe en solution permet d'augmenter la solubilité des principes actifs⁷³ qui sont, pour la plupart, très peu solubles^{276,277} et donc d'en introduire une plus grande quantité au sein des assemblages lors des dépositions successives. Selon les applications visées, et les effets désirés, il peut être judicieux de tenir compte de ces différents avantages et inconvénients.

Le savoir-faire du laboratoire, antérieur à ce travail, se basait principalement sur l'exploitation de la première couche de cyclodextrines thermofixée sur textiles en tant que système de piégeage de principes actifs sur les supports (Système 3, cf. Figure 41)^{85, 86, 88}. Cette technique a déjà prouvé son efficacité vis-à-vis de la libération de principes actifs particulièrement^{92,97,229}. Ainsi, des prothèses vasculaires ont pu être modifiées pour permettre la libération de ciprofloxacine

jusqu'à quelques heures ou jours selon le milieu de libération⁵². C'est pourquoi, nous avons également désiré comparer ce système aux autres systèmes en cours de développement, et des études de libérations du BM ont été menées dans l'eau et dans le PBS.

Dans un premier temps, lors de la construction des assemblages, une première différence visuelle apparaît au niveau de la coloration des échantillons (n = 12), comme présentée en Figure 87.

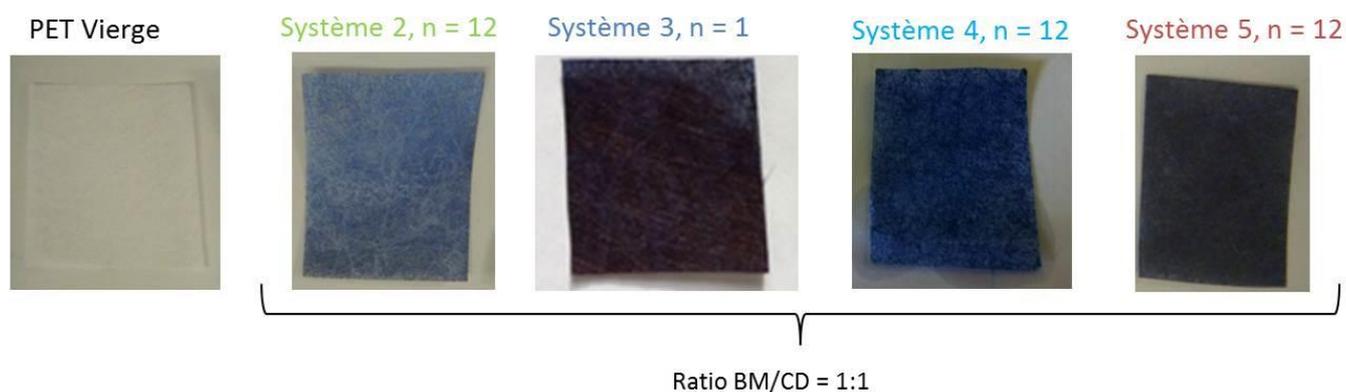


Figure 87 : Photos des différents systèmes étudiés, conditions C, ratio BM/polyCD = 1:1

Les échantillons représentant les systèmes 3, 4 et 5 sont plus foncés que le système 2. A ce stade, il apparaît donc que la quantité de BM introduite en suivant ces deux voies pourrait être plus importante.

IV.6.2. Etudes de libération

Les résultats de la libération en batch dans l'eau, aussi bien les quantités libérées que les cinétiques, sur les différents systèmes présentés construits avec le BM sont compilés en Figure 88.

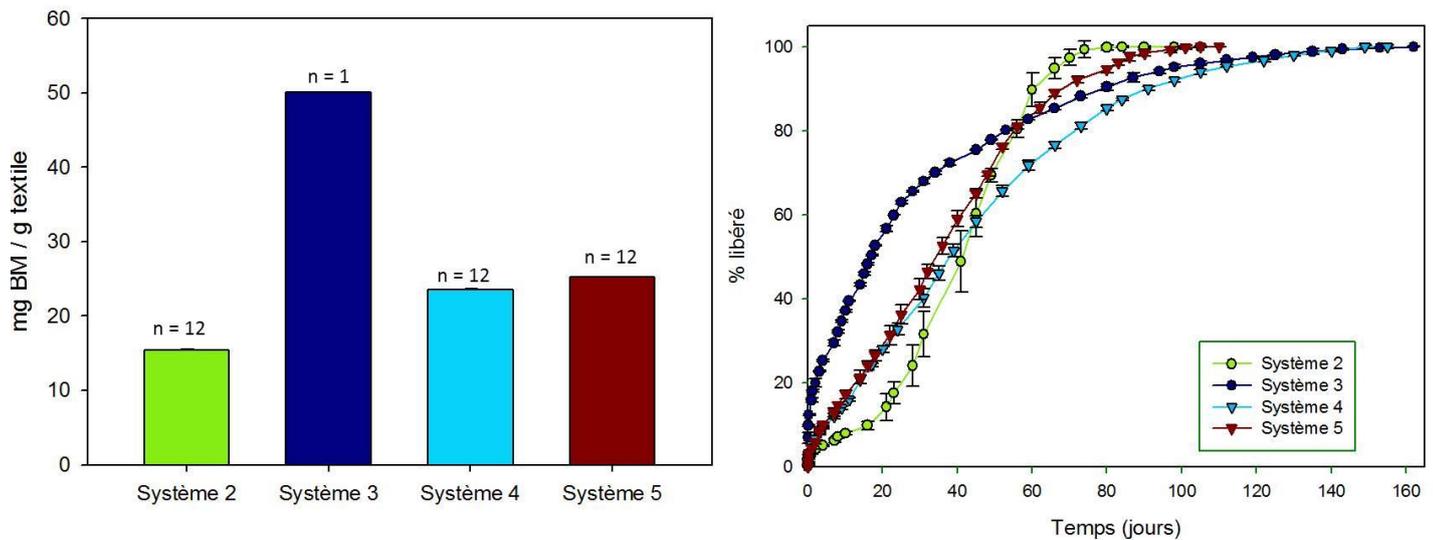


Figure 88 : Quantités totales libérées et cinétique de libération dans l'eau (37°C) des différents systèmes étudiés (conditions C, ratio BM/polyCd = 1:1)

On observe que l'hypothèse faite précédemment selon laquelle la quantité totale libérée est plus importante pour les systèmes 3, 4 et 5 est validée. En effet pour le système 2, 14,4 mg BM / g textile est libéré tandis que cette valeur passe à 23,6 mg BM / g textile pour le système 4, à 25,2 mg BM / g textile pour le système 5 et à 53,2 mg BM / g textile pour le système 3. C'est le système 3 qui présente la quantité totale de BM libérée la plus importante.

Théoriquement, l'on s'attendait à ce que la quantité de BM libérée du système 4 corresponde à la somme des quantités libérées des systèmes 2 et 3. Or, ce taux est bien plus faible (divisé de moitié). Pour le système 3, le BM est adsorbé via l'inclusion dans les cavités mais également via les interactions ioniques avec la 1^{ère} couche thermofixée qui a été optimisée pour obtenir le gain de masse et la CEI les plus élevés (cf. Partie III, I.2). Dans les autres systèmes LbL (2,4 et 5), on a l'érosion de cette couche thermofixée lors du dip-coating, mais aussi une mobilisation des fonctions COOH impliquées dans la formation du complexe ionique avec le CHT ce qui implique une baisse sensible des interactions avec le BM. De plus, lors des étapes successives du procédé dip-coating, il y a libération de petites quantités de BM, et donc une quantité piégée moins importante.

Cet exemple est un cas particulier car le BM est un colorant cationique. Dans le cas d'autres PAM, il peut être attendu de meilleurs résultats avec la technique LbL que par l'utilisation de la 1^{ère} couche thermofixée seule.

En ce qui concerne le système 5, le temps d'imprégnation des assemblages dans la solution de BM utilisé pour la post-imprégnation est de 4h. Ce temps de contact a été choisi de manière à être suffisamment court pour éviter de débiter l'érosion des systèmes multicouches car il a été montré que dans l'eau, la dégradation est importante dans les premières heures du test (cf. Partie III,

V.1, Figure 60.a)). Ce temps n'est peut-être pas suffisant pour permettre une diffusion optimale permettant au BM de diffuser jusqu'aux cavités les plus éloignées de la surface (celles de la 1^{ère} couche thermofixée notamment). En termes de quantités totales libérées, le système 5 s'apparente au système 4, montrant une possible saturation en BM des systèmes multicouches quelque soit la voie de construction des assemblages.

En ce qui concerne les cinétiques, une fois encore, le système 2 est le plus rapide lors de la libération (80 jours). Les systèmes 4 et 5 permettent de ralentir la libération jusqu'à 130 et 101 jours respectivement tandis que le système 3 permet une libération encore plus longue sur 153 jours.

Les assemblages LbL (Système 2, 4 et 5) présentent un ralentissement de la cinétique par rapport au système 3 dans les premiers temps. On observe donc un effet des couches supérieures et de la diffusion du BM au travers de celle-ci au début du phénomène de libération.

Ainsi, selon la voie de construction choisie, on obtient des résultats variables en termes de chargement du dispositif et en termes de cinétique de libération. Les quantités totales libérées peuvent être modulées et les cinétiques de libération ralenties.

IV.7. Application à la libération de 2 PAM dans un même assemblage

L'un des intérêts d'un tel système multicouches, serait la possibilité de complexer différentes molécules thérapeutiques dans un même assemblage via l'utilisation de solutions des complexes de chacun des deux PA (ou plus) avec le polyCD. C'est pourquoi, une complexation simultanée du BM et du vert de malachite (VM) au sein d'un même assemblage a été testée. Le VM a été choisi car c'est un colorant cationique, qui forme un complexe d'inclusion avec les β CD²⁵⁷.

IV.7.1. Etude préliminaire

Dans un premier temps, le spectre UV-visible (Figure 89) a été réalisé dans le PBS d'identifier les bandes d'adsorptions exploitables.

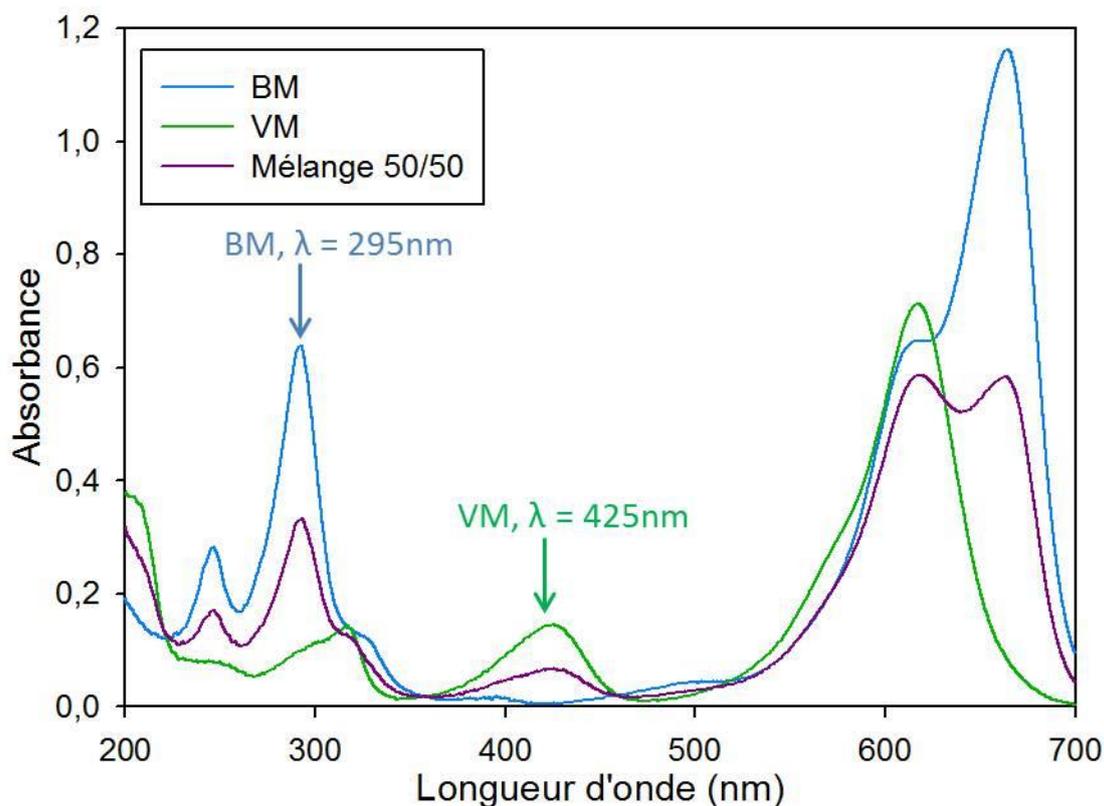


Figure 89 : Spectre UV-visible du BM et du VM seuls et d'un mélange 50/50 (massique)

Le spectre UV-visible montre les bandes d'adsorption des deux colorants et de leur mélange. Nous avons choisi d'exploiter la bande à 295 nm du BM et celle à 425 nm pour le VM, puisqu'elles correspondent à des domaines de longueur d'onde où il n'y a pas (ou peu) de recouvrement des deux spectres. Ainsi, après étalonnage, on pourra déterminer la concentration de chacun dans le mélange au fil de la libération.

L'étude de la complexation du VM avec le polyCTR- β CD est donnée en ANNEXE 5. On remarque les déplacements caractéristiques sur les spectres RMN du proton et, par UV, le déplacement des bandes d'absorption à 426 nm et 617 nm et la diminution de l'absorbance caractéristique²⁵⁷ en présence de β CD puis de polyCTR- β CD. Malheureusement, il a été impossible de déterminer la constante de complexation ce qui laisse supposer des interactions faibles entre le VM et les CD.

IV.7.2. Construction des assemblages

Précédemment, il a été montré qu'il était possible d'utiliser la première couche thermofixée comme réservoir de PAM. Trois assemblages différents ont été construits :

- A1 : Le BM est complexé dans la 1^{ère} couche thermofixée (Voie 2), le reste de l'assemblage est construit avec le complexe VM / polyCD (ratio molaire VM / β CD = 1:1, Voie D)
- A2 : Le VM est complexée dans la 1^{ère} couche thermofixée et la suite de l'assemblage est réalisée avec le complexe BM / polyCD (ratio 1:1, Voie D)
- A3 : Dans le système 3, la couche thermofixée est laissée vide (Voie 3), et l'empilement multicouche est construit en utilisant successivement les complexes BM / polyCD et VM / polyCD comme polyanions (ratios 1:1, Voie C).

Pour une meilleure compréhension, ces systèmes sont schématisés en Figure 90.

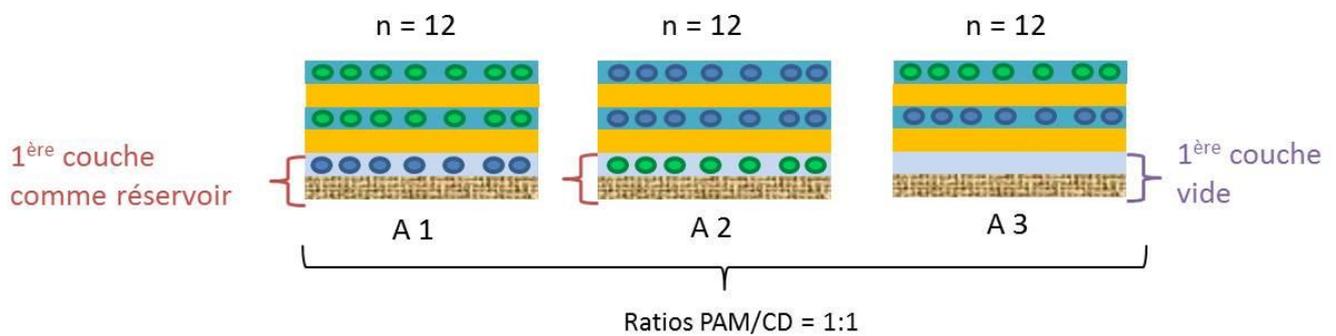


Figure 90: Schématisation des systèmes étudiés à base de 2 PAM (BM et VM)

La Figure 91 suivante présente deux échantillons dont la première couche thermofixée a été chargée par le BM pour l'assemblage A1, et par le VM pour l'assemblage A2. On observe nettement la différence de couleur entre les deux échantillons.

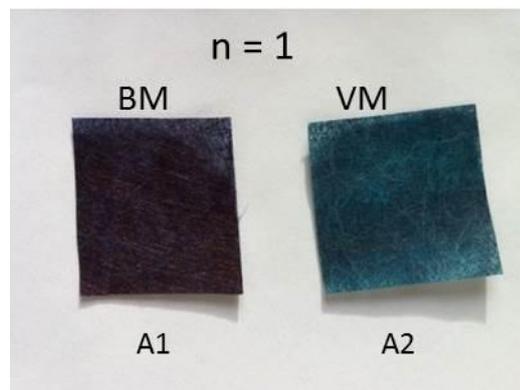


Figure 91: Echantillons des systèmes 1 et 2 (n = 1) utilisant la 1^{ère} couche thermofixée comme réservoir de BM et VM

La construction de ces différents systèmes a été suivie par gravimétrie et les résultats sont présentés en Figure 92.

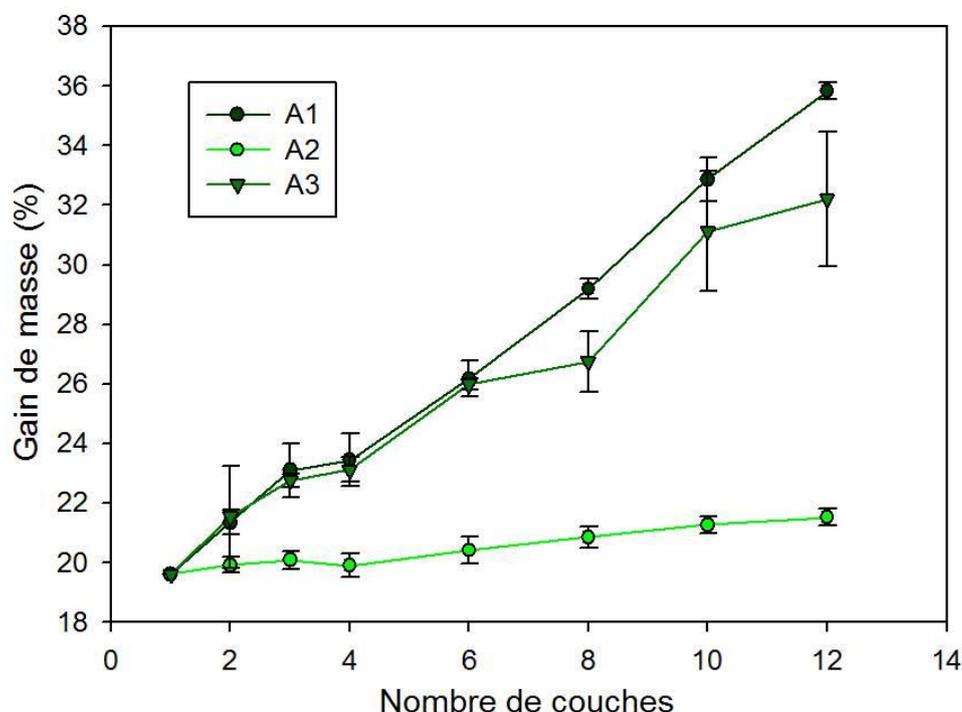


Figure 92: Suivi gravimétrique sur textile de la construction des systèmes avec 2 PAM (BM et VM), (conditions C, ratio PAM/polyCD = 1:1)

On remarque que les trois systèmes n'ont pas le même comportement au cours de la construction. Pour l'assemblage A1, la croissance est linéaire : les paires de couches CHT-B / (MV/polyCD) sont régulières à partir de $n = 4$ (+ 1,5 % par couche). L'assemblage A2 possède quant à lui un gain de masse bien inférieur après 12 couches (21,5 %). Finalement, pour l'assemblage A3, on observe une croissance non linéaire. Les paires de couches incluant le MV (couches 5-6 et 9-10) ont un gain de poids supérieur à celles contenant le BM (couches 3-4, 7-8 et 11-12) : en moyenne le dépôt est de 1,1 % par paire de couches pour le complexe BM / polyCD et de 3,6 % pour le complexe VM / polyCD.

Ces résultats suggèrent une faible affinité de la molécule de VM pour le polyCTR- β CD, qu'il soit sous sa forme thermofixée ou hydrosoluble dans l'assemblage LbL. En effet, comme observé lors de l'étude de la complexation par UV (cf. III.1.2), la molécule de VM ne semble pas présenter un complexe très stable avec les molécules de CD. Dans ce cas, on peut envisager que le polyélectrolyte VM / polyCD s'apparente plutôt au polyCD seul, ce qui explique le peu de perturbation observée pour la construction des couches à base du complexe VM / polyCD.

Les résultats des études de libération vont permettre de valider ou non ces hypothèses.

IV.7.3. Etudes de libération

Les libérations ont ensuite été menées en batch dans le PBS et les quantités libérées de BM et de VM ainsi que les cinétiques pour chaque assemblage sont données en Figure 93.

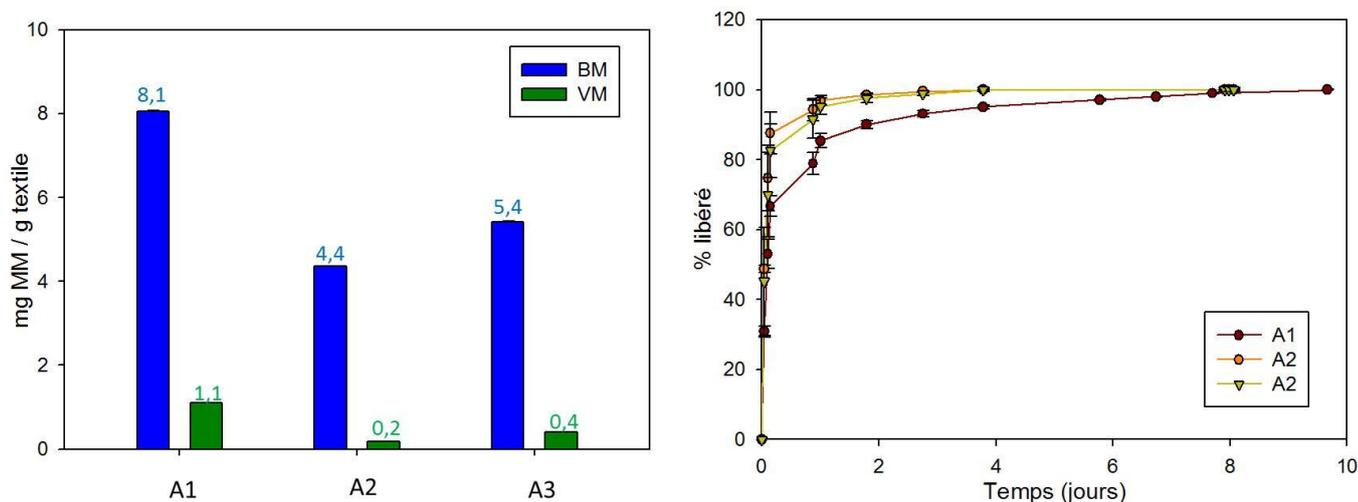


Figure 93 : Quantités totales libérées en VM et BM et cinétiques de libération pour les trois assemblages étudiés ($n = 12$, ratios PAM/CD = 1:1, conditions C)

Les cinétiques (cf. Figure 93, à droite) sont très similaires pour tous les échantillons, et comme précédemment, l'intégralité des PAM introduits est libérée après 3 jours.

On observe en Figure 93 (gauche) que peu de VM est incorporé dans les dispositifs, que ce soit dans la couche thermofixée ou dans le film multicouche. Ceci confirme la faible affinité de ce colorant pour le polyCTR- β CD, qu'il soit sous sa forme thermofixée (1^{ère} couche), ou sous sa forme hydrosoluble déposée par auto-assemblage.

En revanche, le BM est bien intégré dans l'assemblage A1 où il est présent dans la couche thermofixée, mais aussi dans les assemblages A2 et A3 où il est présent dans le film LbL uniquement. La forte présence du BM dans le système 2 en dépit d'un film LbL peu développé ($n = 12$ couches, correspondant à un gain de masse total en couches auto-assemblées de 1,9 %, cf. Figure 92) laisse supposer que du BM de la solution de complexe soluble BM / polyCD ait aussi diffusé dans la couche thermofixée, peu chargée en VM.

Pour le système 3, le complexe VM / polyCD n'a pas perturbé l'assemblage des couches du film car ce complexe peu stable présente les caractéristiques proches de celles du polyCTR- β CD seul. On peut donc supposer, comme dans le cas du système 2, que du BM « libre » ait diffusé dans la couche thermofixée lors des étapes d'imprégnation du complexe BM / polyCD sur le film.

En conclusion de cette partie, nous avons choisi le VM et le BM dans ce système de libération pour des raisons de suivi aisé par spectroscopie UV-visible (non recouvrement des bandes d'adsorption) mais les résultats ont montré que ce couple de PAM n'était finalement pas idéal, puisqu'une nette sélectivité est apparue au bénéfice du BM. On pourrait envisager de tester de nouveaux couples de PAM, neutres ou anioniques afin de favoriser les interactions PAM / polyCD et de ce fait avoir une meilleure vue d'ensemble des différents phénomènes entrant en jeu dans ce type de dispositif.

IV.8. Conclusion

Dans cette partie, la libération des PAM en fonction de différents paramètres de construction a été étudiée.

Tout d'abord, le nombre de couches déposé à la surface du support possède une influence plus ou moins importante : plus le nombre de couche est élevé et plus les quantités de PAM piégées et libérées sont importantes. Ensuite, la cinétique de libération dépend du ratio molaire des complexes PAM / polyCD utilisé pour former le complexe des couches.

Pour des assemblages présentant les mêmes conditions de construction LbL (voie C, ratio PAM/CD 1:1) et le même nombre de couches, un CHT de masse molaire plus élevée permet de ralentir visiblement la cinétique de libération dans l'eau. Cependant, cet effet n'est plus visible dans le PBS ou le MEM, de même que pour la post-réticulation par la génipine, confirmant l'hypothèse que ce sont les couches anioniques qui constituent les points faibles des assemblages.

Par ailleurs, lors des libérations, nous avons pu mettre en évidence un phénomène de diffusion des PAM à travers les films multicouches vers la solution, et de la solution vers l'intérieur du film multicouches (y compris jusqu'à la couche thermofixée). Les phénomènes de diffusion sont rapides dans les deux sens et dépendent des conditions opératoires. La libération des PAM par diffusion se produit majoritairement dans les milieux où la dégradation des assemblages est lente (H₂O). Dans les milieux plus agressifs (PBS, plasma), elle dépend plutôt de la cinétique plus rapide de désintégration du film LbL.

En dernier lieu, les quantités libérées et les cinétiques de libération dans l'eau peuvent être modulées en fonction de la voie de chargement des PAM dans les assemblages (Voies B, C ou D). En effet, il est possible d'utiliser les propriétés de complexation de la 1^{ère} couche thermofixée pour piéger une quantité plus importante de PAM et obtenir une libération ralentie.

V. Cytocompatibilité et activité antibactérienne

Il est indispensable d'évaluer la cytocompatibilité des dispositifs vis-à-vis de cultures cellulaires puisque ceux-ci ont des applications médicales. Nous avons également évalué l'activité antibactérienne *in vitro* d'un dispositif chargé en BM, ce PAM ayant des propriétés antimicrobienne.

V.1. Cytocompatibilité

Dans un premier temps, des tests de vitalité et de prolifération cellulaire ont été réalisés après 3 et 6 jours en contact direct sur des échantillons textiles modifiés par le film multicouches. Les CHT-B et CHT-M ont été utilisés pour la construction, et la post-réticulation par la génipine a également été réalisée.

Les résultats sont présentés ci-après dans la Figure 94. Selon la norme ISO 10993-5, on considère que des échantillons sont toxiques quand la prolifération ou la vitalité cellulaire est inférieure à 70 %.

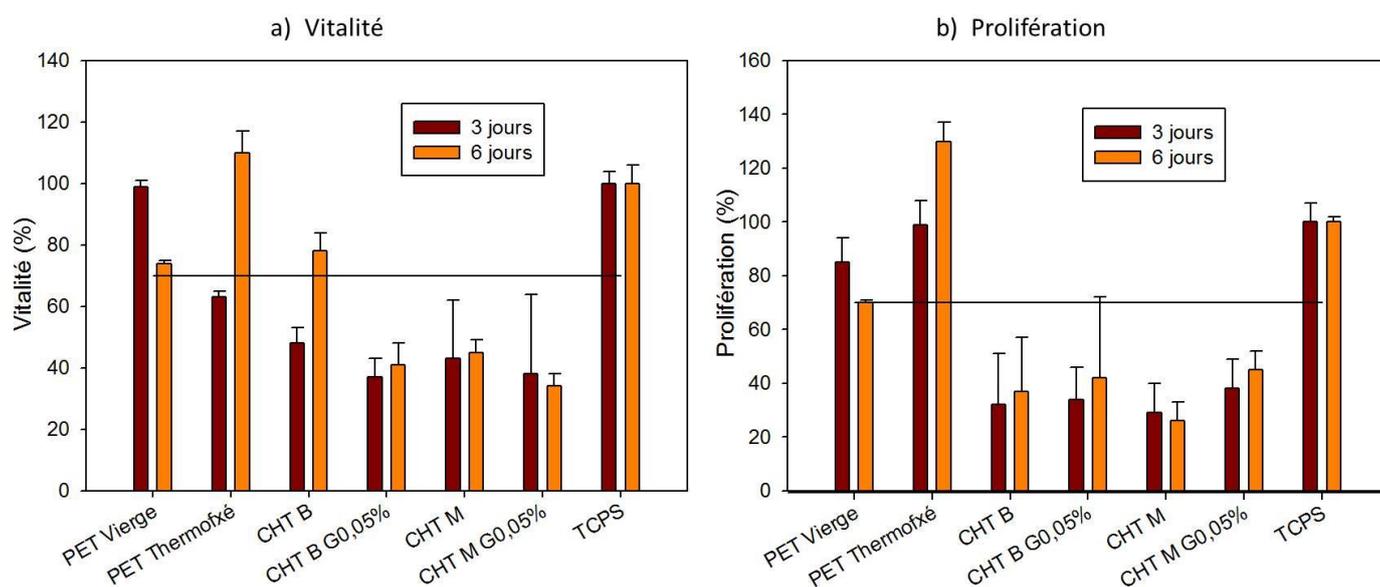


Figure 94 : a) Vitalité et b) prolifération d'une lignée de cellules épithéliales pulmonaires L132 en contact direct avec des échantillons à 12 couches, construits à partir de CHT B et CHT M (conditions C), réticulés ou non par la gpn (0,05%)

Les résultats des tests de vitalité et de prolifération cellulaire montrent une cytocompatibilité du PET Vierge après 3 et 6 jours. De même, le PET thermofixé est également biocompatible avec des taux respectifs de vitalité et de prolifération à 3 jours de 63 % et 99 % qui augmentent à 6 jours (110 % et 130%). Ce résultat confirme que l'enrobage des fibres par le polyCTR- β CD thermofixé n'apporte

pas de toxicité par rapport au support initial, voire même améliore sa cytocompatibilité, ce qui avait déjà été montré pour des études précédentes^{94,226}. Cependant, pour les échantillons LbL de 12 couches, la cytocompatibilité décroît. Les échantillons réticulés avec la génipine ne sont pas plus toxiques que ceux non-réticulés, il n'y aurait donc pas de trace de génipine libre dans l'assemblage. De même, l'utilisation du CHT-B ou du CHT-M dans l'assemblage ne semble pas avoir de véritable influence, positive ou négative, sur la cytotoxicité des échantillons.

Cette toxicité de l'assemblage multicouches peut être expliquée par les fortes concentrations en CHT et en polyCTR- β CD qui pourraient être libérées dans les 1 mL de milieu MEM utilisés pour le test. En effet, comme montré précédemment, dans le milieu MEM, la déstructuration des échantillons est complète après seulement 3 jours pour tous les échantillons. Des études précédentes menés sur le polyCTR- β CD ont montré que ce polymère était toxique vis-à-vis des cellules à fortes concentrations (2,6 mg/mL)⁹⁴. Or, pour les assemblages de 12 couches sans BM, un minimum de 3 mg/mL de polyCTR- β CD est contenu dans le milieu de culture. Ainsi, la concentration limite est dépassée, ce qui conduit à la toxicité observée des échantillons. Des tests préliminaires ont montré qu'en augmentant la concentration d'une solution de CHT de 0 à 400 mg/L, le taux de survie diminuait de 100 à 85% (cf. Figure 95). Le CHT aurait donc, quant à lui, un impact faible sur la cytocompatibilité.

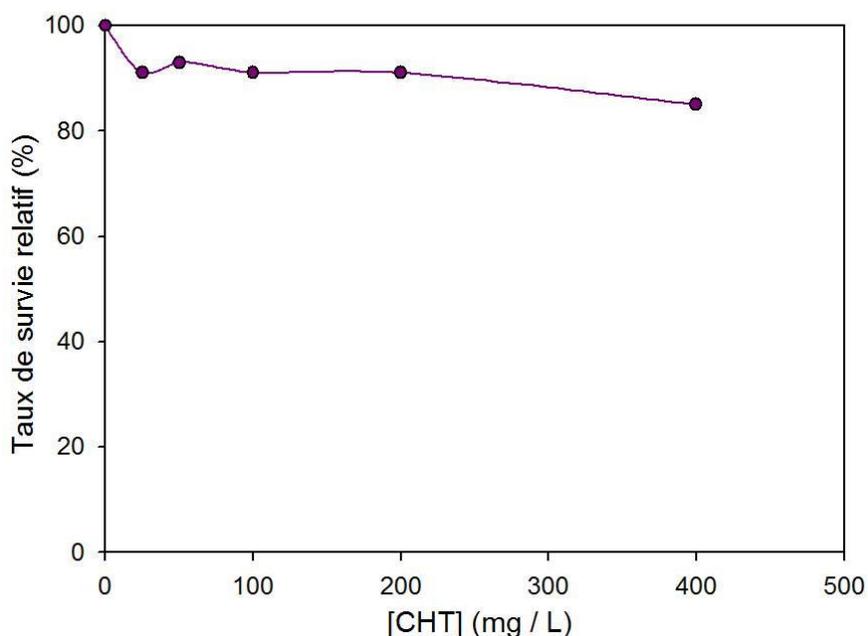


Figure 95 : Cytotoxicité du CHT (CHT-B) sur les cellules L132

Il faut également garder en mémoire que ces tests ont été réalisés dans des conditions statiques, sans changement de milieu de culture pendant 6 jours. Or, lors d'une implantation dans le corps, celles-ci sont encore différentes. Dans ce cas les échantillons sont soumis un flux continu de fluides, ce qui signifie un renouvellement constant du milieu et de plus faibles concentrations en polyélectrolytes présentes au même moment. Par ailleurs, cette toxicité peut éventuellement être diminuée en ajustant les paramètres de thermofixation pour la formation de la première couche enrobée. En effet, dans cette étude, nous avons cherché à travailler avec les taux de déposition les plus élevés mais il est tout à fait envisageable de diminuer les 19,6 % déposés lors de la première étape, afin de diminuer le taux de polyCTR- β CD dans le milieu.

V.2. Activité antibactérienne du système chargé de BM

Puisque le BM est un agent antimicrobien^{278,279}, des tests ont été réalisés sur une souche réputée pour causer des infections au niveau des dispositifs médicaux : la souche *Staphylococcus epidermidis* (05001). En effet, *S. epidermidis* est souvent à l'origine d'infections et est capable d'adhérer à la plupart des surfaces des dispositifs médicaux, tels que les cathéters ou les prothèses^{280,281}.

La libération du BM présent dans les échantillons est suivie au cours du temps dans le PBS. Les échantillons sont mis en contact avec le PBS pendant des durées déterminées. Ils sont ensuite prélevés du milieu et déposés sur une gélose Agarensemencée de la suspension bactérienne de *S. epidermidis*. La présence ou non d'une zone d'inhibition autour de l'échantillon, ainsi que son diamètre renseigne sur la présence d'une activité antibactérienne (comme montré en exemple dans la Figure 96) et permet de quantifier cette activité en fonction du temps de séjour des échantillons dans le PBS.

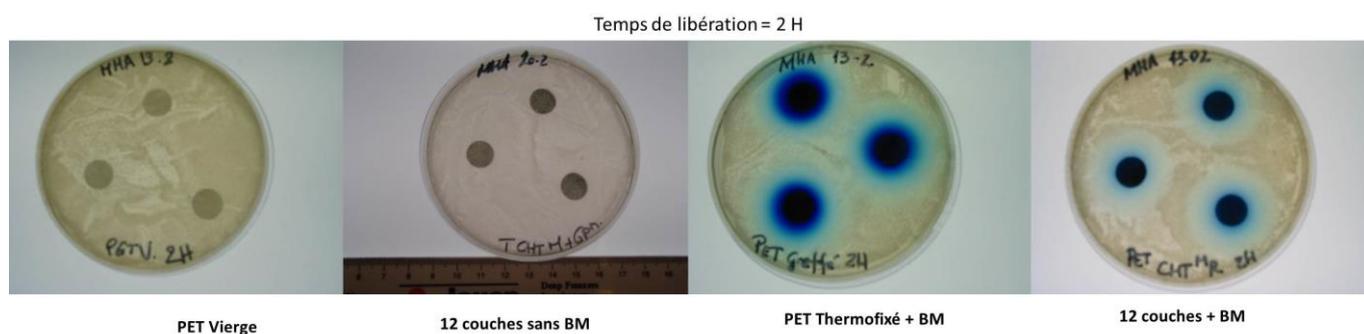


Figure 96 : Exemple des cercles d'inhibition obtenus après 2H de libération

Les échantillons construits avec les deux CHT, avec ou sans réticulation par la génipine ont été testés pour visualiser l'éventuelle influence de ces facteurs sur l'activité du BM (12 couches). Ils sont également comparés avec des échantillons ayant seulement subi une fonctionnalisation par la couche thermofixée.

Des échantillons de PET vierge et des échantillons multicouches construits sans BM ont également été testés. Ils n'ont montré aucune activité contre la souche bactérienne puisqu'aucune zone d'inhibition n'apparaît autour des pastilles.

Les diamètres d'inhibition contre *S. epidermidis* pour les échantillons à base de BM, utilisant uniquement la 1^{ère} couche thermofixée (Système 3, cf. Figure 41), construits avec les deux CHT-B et CHT-M (Système 2, Voie C) avec ou sans réticulation sont présentés en Figure 97. La ligne à 1,1 cm correspond au diamètre des échantillons.

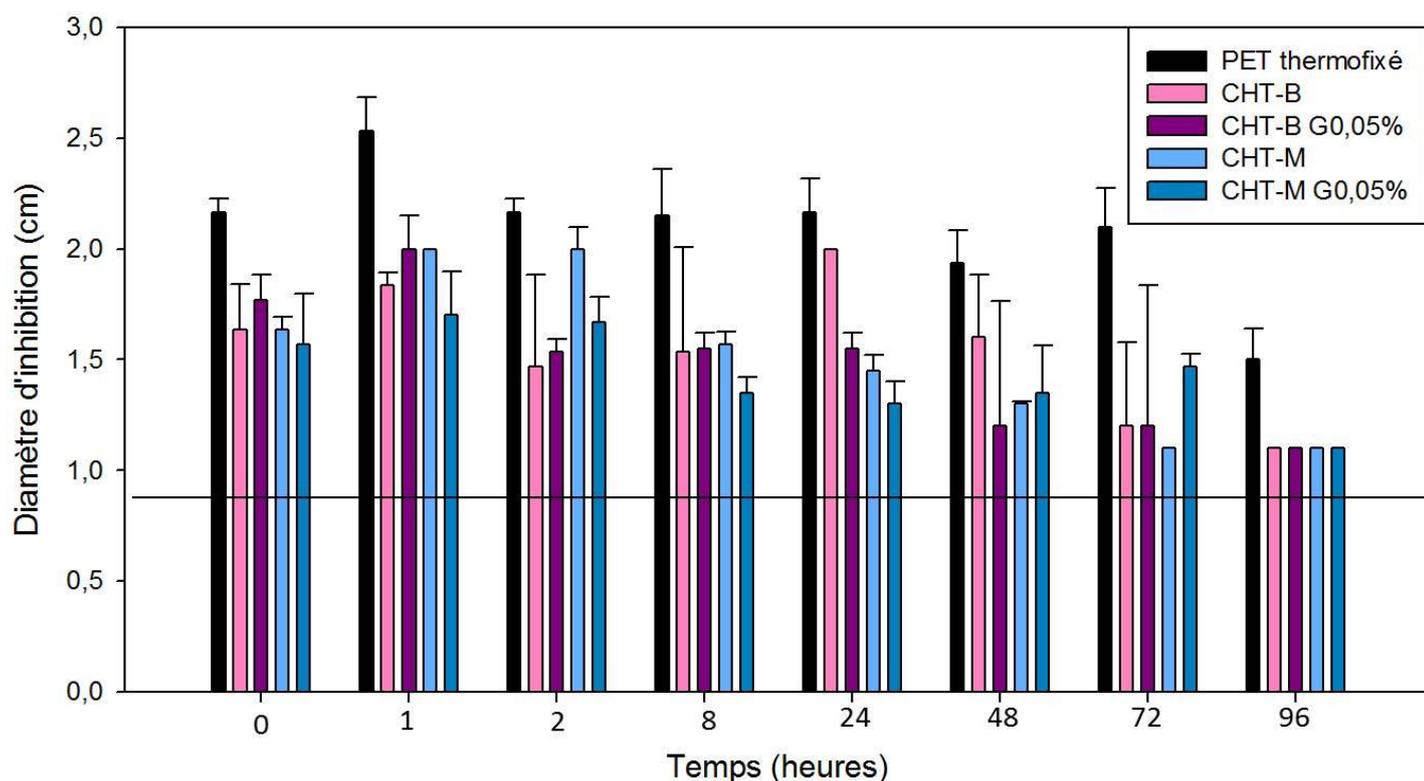


Figure 97 : Diamètre d'inhibition contre *S. epidermidis* pour des assemblages avec ou sans réticulation ($n = 12$, ratio BM/CD = 1:1, conditions C) construits selon la Voie 3 avec a) CHT B et b) CHT M

Tout d'abord, puisque la quantité de BM adsorbée est plus élevée et que la cinétique de libération est plus longue en utilisant uniquement la première couche thermofixée (cf. Figure 88), l'activité antibactérienne est plus importante (diamètres plus importants) et plus longue (il y a

toujours une activité après 4 jours) pour ces échantillons. Au vu du profil de libération présenté précédemment, on peut espérer une activité jusqu'à plusieurs jours avec le PET thermofixé.

Pour les échantillons multicouches, on peut remarquer une activité antibactérienne décroissante visible sur 72h. Ces résultats sont en accord avec les temps de libération précédemment déterminés, puisque dans le PBS, l'intégralité du BM est libérée après 3 jours (cf. Figure 84) que l'échantillon soit à base de CHT-B ou de CHT-M, réticulé ou non. Ces résultats sont en parfaite corrélation avec les études de dégradation et de libération précédemment exposées.

On constate donc la possibilité de complexer le BM dans ces assemblages multicouches, sans perte de son activité. En fonction de la stabilité de l'assemblage et des profils de libération du PA introduit, il apparaît envisageable d'obtenir des effets prolongés au niveau du textile.

Perspectives

Les résultats présentés ci-avant ont amené, au cours de la thèse, à réfléchir à différentes possibilités pour la suite du projet afin d'améliorer et de mieux contrôler ces assemblages multicouches. Voici les perspectives qui découlent de ces réflexions.

1. Assemblages 100 % cyclodextrines

Une première perspective est de réaliser un assemblage composé à 100 % de polymères de cyclodextrines. De cette façon, chaque couche de l'assemblage pourrait être chargée en molécule active, conduisant à des quantités libérées plus importantes, mais aussi à un dispositif multi-fonctions en introduisant différents principes actifs.

Des études sont en cours au laboratoire pour synthétiser, un polymère de cyclodextrine cationique et biocompatible qui permettrait de remplacer le CHT dans les couches cationiques. Une fois optimisé, ce polymère sera testé pour la complexation des PAM et utilisé dans la construction d'assemblages multicouches constitués à 100% de polymères de cyclodextrines.

2. Dépôt d'une couche terminale de PLGA

Les différentes stratégies (Mw du CHT, réticulation par la génipine) présentées ci-avant, pour des assemblages similaires construits selon la Voie C (système 2, même ratio PAM/CD, même nombre de couches), ont montré qu'il n'était pas possible de moduler la libération du BM dans le PBS et que la libération ne s'étend pas au-delà de trois jours pour de tels systèmes. Or, des périodes de libération plus longues sont souvent recherchées.

Outre la masse molaire du CHT et la post-réticulation des assemblages, une autre stratégie peut être envisagée. Il s'agit de déposer, soit à la surface des assemblages multicouches soit au milieu des assemblages, une couche agissant comme une barrière à la dégradation des assemblages et à la diffusion du PAM²⁸². De tels systèmes présentant une barrière biodégradable ont déjà été étudiés et ont montré des résultats prometteurs^{207,283}. Le Poly(acide lactique co-glycolique) ou PLGA, est régulièrement utilisé pour de telles applications puisqu'il permet une dégradation progressive *in vivo* par hydrolyse ou par action enzymatique²⁰⁷. On peut alors envisager d'utiliser cet effet barrière pour ralentir la dégradation des assemblages mais aussi la diffusion des PAM au travers de ceux-ci.

Le PLGA - qui est non toxique, biocompatible et biodégradable²⁴⁹ - a été utilisé ici afin de réaliser une étude préliminaire pour visualiser l'influence de cette barrière déposée en surface de l'un des assemblages multicouches sur la libération du BM dans le PBS. Par la technique de

fouardage, une couche de PLGA (20 g/L dans le dichlorométhane) a été déposée à la surface d'assemblages multicouches (n = 12) construits selon la Voie C (cf. Figure 98).

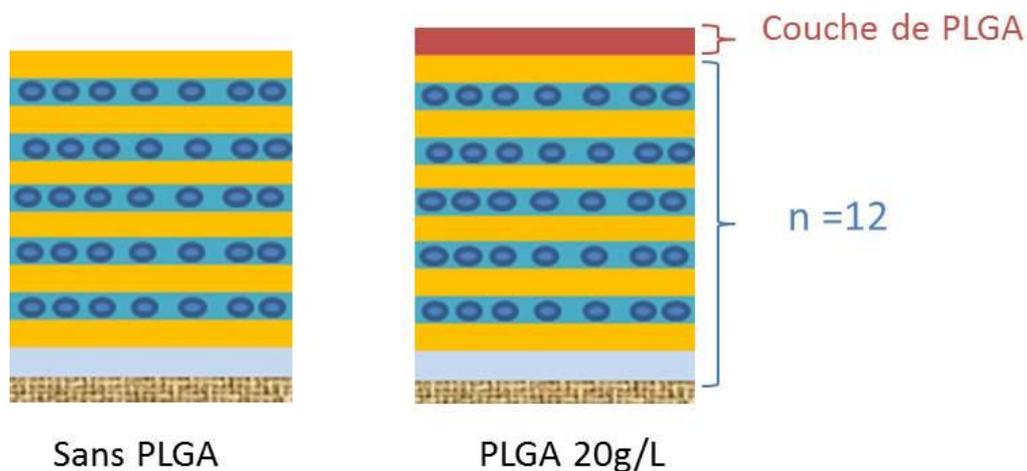


Figure 98: Schématisation des échantillons testés avec et sans PLGA à 20 g/L (n = 12, ratio BM/CD = 1:1, conditions C)

Des tests de dégradation et de libération dans le PBS ont été menés sur ces échantillons et comparés au système sans PLGA. Les résultats sont donnés dans la Figure 99 :

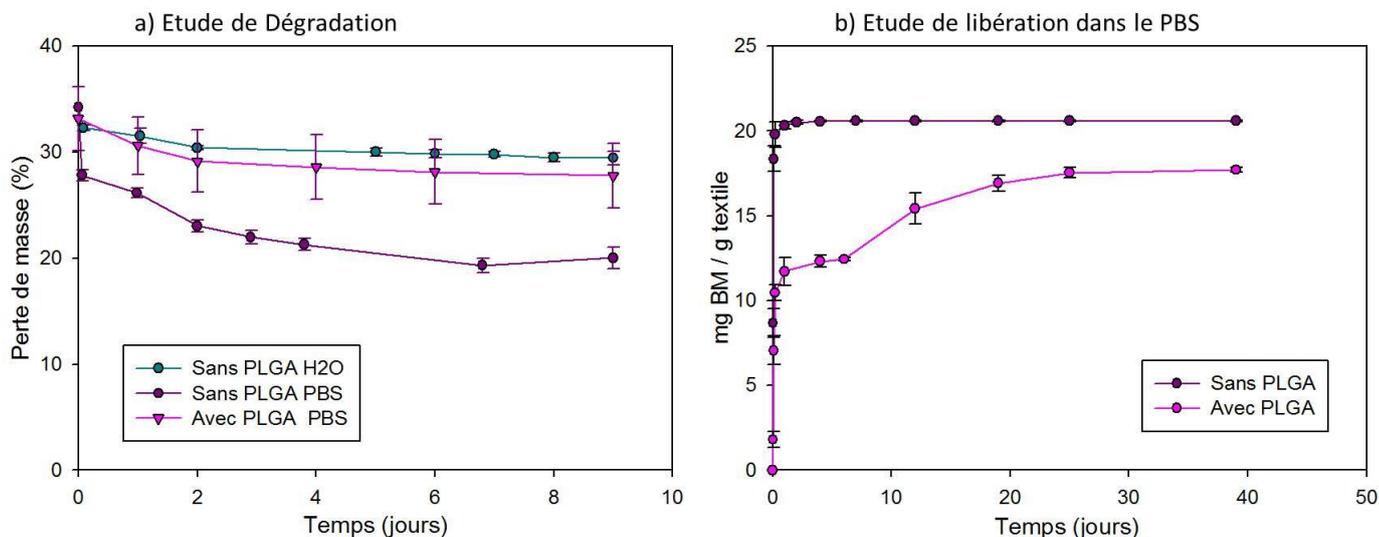


Figure 99 : a) Etude de dégradation des systèmes 1 et 2 dans l'eau et le PBS et b) Etude de libération dans le PBS ; (n = 12, ratio BM/CD = 1:1, conditions C, [PLGA] = 20 g/L)

La première étude de dégradation (cf. Figure 99.a)), montre nettement que le PLGA permet de ralentir la déstructuration des assemblages dans le PBS. Le comportement se rapproche de celui observé dans l'eau pour les mêmes assemblages avec une dégradation lente et progressive au cours du temps.

En ce qui concerne l'étude de libération dans le PBS, (cf. Figure 99.b)) la différence de profil est encore plus marquée. Comme précédemment, le système sans PLGA libère très rapidement (3 jours) la totalité du BM complexé (20,6 mg BM / g textile). Dans le cas du système avec PLGA, une libération en deux étapes est observée : une première étape permet la libération rapide d'une importante quantité de BM (12,3 mg BM / g textile) après 4 jours, suivie d'une seconde libération plus progressive jusqu'à atteindre 17,7 mg BM / g textile après 25 jours. La différence des quantités libérées finales entre les deux systèmes avec et sans PLGA s'explique par le trempage de l'échantillon dans la solution de PLGA pour déposer cette dernière couche, qui conduit à la perte d'une petite quantité de BM dans la solution de PLGA dans le dichlorométhane.

Il a déjà été démontré, dans la littérature, que le PLGA présentait une dégradation en deux temps ce qui permettait, notamment, d'obtenir des libérations de principes actifs en deux étapes²⁸⁴. Cette propriété du PLGA est très utile dans notre cas puisque le dépôt de cette dernière couche permet de ralentir la déstructuration des assemblages multicouches et donc d'obtenir une libération progressive du BM au cours du temps, qui passe de 3 jours à plus de 20 jours dans le PBS.

Pour la suite, d'autres tests sont à réaliser afin de déterminer l'influence de la concentration de la solution de PLGA. En effet, en fonction de l'épaisseur de la couche déposée, les profils de dégradation / libération peuvent éventuellement varier permettant d'allonger ou de raccourcir les temps de libérations. On pourrait également envisager d'utiliser une telle couche biodégradable présentant des charges à plusieurs niveaux de l'édifice, permettant alors de réaliser des assemblages multicouches multi-compartimentés et multi-thérapeutiques (cf. Figure 100).

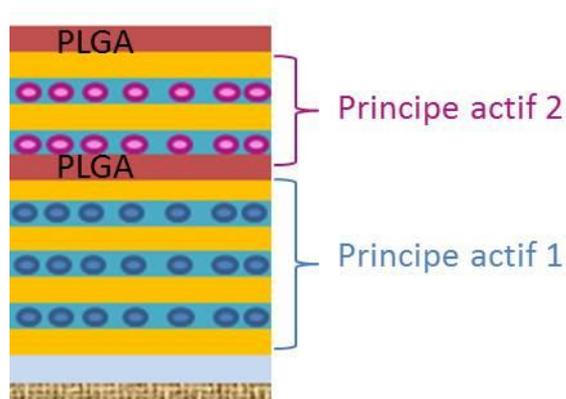


Figure 100 : Exemple d'assemblage multi-compartimenté et multi-thérapeutique

Conclusion générale

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'une étude visant à démontrer la faisabilité de la construction de systèmes multicouches sur un support textile, en vue d'une application pour la libération prolongée de principes actifs.

Notre stratégie s'est portée sur l'utilisation du savoir-faire du laboratoire concernant la fonctionnalisation de textile et la synthèse de polymère anionique de cyclodextrines, en proposant une évolution du concept grâce à la technique layer-by-layer, reposant sur la formation de films multicouches par interactions ioniques. Dans ce cas, l'utilisation des molécules cages permet la complexation de molécules actives au sein des assemblages.

L'objectif premier de cette étude semble avoir été atteint puisque de tels assemblages (vides et avec molécules piégées) jusqu'à 20 couches, ont pu être réalisés et caractérisés, présentant un dépôt significatif et optimisé en surface, ainsi qu'une alternance des charges positives et négatives selon la couche déposée à la surface.

Une fois la faisabilité démontrée, le challenge principal de ce projet était de réaliser des assemblages présentant des quantités de molécules actives libérées suffisantes pour permettre ultérieurement de délivrer une dose thérapeutique, mais montrant également une bonne stabilité dans le temps, afin de prolonger au maximum cette libération.

De nombreux facteurs influençant la construction / dégradation des assemblages et *a fortiori* la libération des molécules complexées dans les assemblages ont pu être mis en évidence. Le milieu de contact semble, en particulier, avoir une très grande influence sur les assemblages puisque ceux-ci se dégradent plus ou moins rapidement selon qu'ils sont mis en contact avec de l'eau, un milieu salin (PBS), acide acétique ou encore un milieu physiologique (3 à plus de 70 jours de libération). Les conditions opératoires (concentrations en polyélectrolytes, voies de construction, masse molaire des PE...), le nombre de couches en surface, le ratio PAM / polyCD utilisé pour la formation du complexe et l'utilisation de la première couche thermofixée ont également été investigués. En jouant sur ces différents paramètres, il a notamment été possible de moduler les quantités totales libérées et les vitesses de libération. Un phénomène de diffusion des molécules au travers des assemblages a également été mis en évidence.

Grâce aux résultats microbiologiques, il a été prouvé que le bleu de méthylène inclus gardait toute son activité lors de la formation des assemblages et ce, aussi longtemps que la libération se prolonge. Si les résultats de cytocompatibilité ne sont pas encore totalement acceptables, c'est que les essais ont été optimisés pour des dépôts maximums et que les concentrations limites de toxicité vis-à-vis des cellules en solution sont dépassées. Il est cependant envisageable de diminuer les dépôts successifs afin de diminuer cette toxicité intrinsèque.

Néanmoins, pour des assemblages identiques en termes de construction et de nombre de couches, si une augmentation de la masse molaire du CHT et une réticulation des assemblages pour renforcer la cohésion ont été testés, ces deux facteurs n'ont pas permis de ralentir la libération du PAM dans le PBS, qui s'effectue sur seulement 3 jours. C'est pourquoi une autre stratégie a été rapidement étudiée en fin de thèse, afin de permettre une libération plus progressive. L'utilisation d'une barrière de polymère biodégradable (PLGA) a montré des résultats prometteurs au niveau de la dégradation et de la libération, permettant de les prolonger de plusieurs jours.

Par la suite, le but est d'améliorer ces premiers résultats pour arriver à contrôler la libération des molécules, en insérant par exemple plusieurs couches barrières à des niveaux différents au sein d'un même assemblage, pour ralentir la diffusion des PAM et la dégradation trop rapide de l'édifice, et ainsi former des assemblages multi compartimentés. Un tel assemblage permettrait la complexation de différentes molécules dans le même dispositif, avec des libérations plus ou moins retardées, puisqu'il a aussi été montré dans cette étude la possibilité de piéger au moins deux molécules modèles au sein d'un même édifice. On obtiendrait alors un dispositif multi thérapeutique, capable de traiter simultanément plusieurs pathologies. Des études similaires ont d'ailleurs déjà été menées par Garza et son équipe, et ont montré la possibilité d'introduire, par spray, une couche de PLGA solubilisé dans le dichlorométhane, au milieu d'un assemblage, et qui agit comme une barrière à la dégradation.

Ce travail nous a donc permis de montrer l'utilité et les promesses en terme de libération de principes actifs des textiles fonctionnalisés par des assemblages multicouches à base de cyclodextrines. Si les temps de libération dans les milieux physiologiques paraissent encore un peu courts (3 jours), des recherches plus poussées sur les effets barrières seront à mener à la suite de ce projet, pour augmenter la durabilité des assemblages dans les différents milieux. Une fois ce dernier aspect maîtrisé, les applications pour ces systèmes apparaissent nombreuses.

Toutefois, certains critères n'ont pas encore été pris en compte dans cette étude. En effet, la construction d'un tel édifice sur le support textile crée une rigidification visible de l'ensemble et des

tests mécaniques (traction, fatigue...) sont à prévoir, afin d'assurer que le design et la fonction des différents implants n'en sera pas affecté. Il s'agit effectivement de ne pas modifier ou dégrader les propriétés initiales du textile, qui doit, si besoin, rester un minimum perméable et relativement souple, comme c'est le cas pour des applications vasculaires par exemple.

La réalisation de cette thèse m'a permis d'appréhender le domaine des biomatériaux et des dispositifs implantables en particulier, et les nombreux échanges avec tous les collaborateurs (UMET, GRB, IBMM) m'ont beaucoup apporté. La pluridisciplinarité du projet m'a permis de travailler dans plusieurs domaines (chimie, textile, biologie) et de mettre en évidence la complémentarité de ces différentes disciplines.

Ce projet a fait l'objet de publications et de conférences lors de colloques nationaux et internationaux, et la présentation de ces résultats s'est d'ailleurs vu gratifier, à deux reprises, du prix de la communication au cours de congrès français : le 5^{ème} JNOEJC à Villeneuve d'Ascq, le 8 Juin 2012 et le JEPO 40, à Anduze, du 30 septembre au 5 octobre 2012.

Ces résultats ont également servi de base pour deux sujets de thèses en collaboration entre l'UMET et l'Unité Inserm U1008, toujours en cours, appliqués aux systèmes multicouches ; l'une visant spécifiquement une application pansement et la seconde visant à réaliser des assemblages 100 % à base de cyclodextrines à partir de la synthèse d'un polymère cationique de CD.

Références

1. Consultants Développement et Conseil - Etude sur les textiles techniques. DGE, Ministère de l'Industrie: 2006.
2. Les textiles techniques: Le futur se tisse en France. DGE, Ministère de l'Économie, des Finances et de l'Emploi: 2006.
3. Payen, J., Utilisation des matériaux textiles sur le marché de la santé. *Techniques de l'ingénieur - Textiles traditionnels et textiles techniques 2012*, base documentaire : TIB572DUO (ref. article : n2570).
4. <http://www.girodmedical.com/>.
5. Devaux, E.; Aubry, C.; Campagne, C.; Rochery, M., PLA/carbon nanotubes multifilament yarns for relative humidity Textile sensor. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics 2011*, 6 (3), 13-24.
6. Gopalsamy, C.; Park, S.; Rajamanickam, R.; Jayaraman, S., The Wearable Motherboard™: The first generation of adaptive and responsive textile structures (ARTS) for medical applications. *Virtual Reality 1999*, 4 (3), 152-168.
7. Catrysse, M.; Puers, R.; Hertleer, C.; Van Langenhove, L.; van Egmond, H.; Matthys, D., Towards the integration of textile sensors in a wireless monitoring suit. *Sensors and Actuators A: Physical 2004*, 114 (2-3), 302-311.
8. Vercruyse, J., L'approvisionnement en textiles tissés. Quels textiles pour les hôpitaux de demain ? . *Eurasanté - Atelier 28 Février 2008*.
9. www.hartmann.fr/.
10. www.medline.com/fr/.
11. <http://www.urgomedical.fr>.
12. <http://www.perousemedical.com>.
13. <http://www.lagarrigue.com>.
14. <http://www.cousin-biotech.com>.
15. Horrocks, A. R.; Anand, S. C., Handbook of Technical Textiles. Woodhead Publishing.
16. Struszczyk, M. H.; Olejnik, M., Assessment of prospect of textile technologies for medical devices. *Fibres and Textiles in Eastern Europe 2012*, 95 (6), 28-36.
17. Kauffman, G. B., Wallace Hume Carothers and nylon, the first completely synthetic fiber. *J. Chem. Educ. 1988*, 65 (9), 803.
18. Czajka, R., Development of medical textile market. *Fibres & Textiles in Eastern Europe 2005*, 13 (1), 49.

19. Pohle, D.; Damm, C.; Neuhof, J.; Rösch, A.; Münstedt, H., Antimicrobial properties of orthopaedic textiles after in-situ deposition of silver nanoparticles. *Polymers and Polymer Composites* **2007**, *15* (5), 357-363.
20. Fricain, J. C.; Granja, P. L.; Barbosa, M. A.; de Jéso, B.; Barthe, N.; Baquey, C., Cellulose phosphates as biomaterials. In vivo biocompatibility studies. *Biomaterials* **2002**, *23* (4), 971-980.
21. Altman, G. H.; Diaz, F.; Jakuba, C.; Calabro, T.; Horan, R. L.; Chen, J.; Lu, H.; Richmond, J.; Kaplan, D. L., Silk-based biomaterials. *Biomaterials* **2003**, *24* (3), 401-416.
22. Vepari, C.; Kaplan, D. L., Silk as a biomaterial. *Progress in Polymer Science (Oxford)* **2007**, *32* (8-9), 991-1007.
23. Patel, V. R.; Parks, B. G.; Wang, Y.; Ebert, F. R.; Jinnah, R. H., Fixation of patella fractures with braided polyester suture: a biomechanical study. *Injury* **2000**, *31* (1), 1-6.
24. King, M. W.; Guidoin, R. G.; Gunasekera, K. R.; Gosselin, C., Designing polyester vascular prostheses for the future. *Medical progress through technology* **1983**, *9* (4), 217-226.
25. Cobb, W. S.; Kercher, K. W.; Heniford, B. T., The argument for lightweight polypropylene mesh in hernia repair. *Surgical Innovation* **2005**, *12* (1), 63-69.
26. Antonopoulos, I. M.; Nahas, W. C.; Mazzucchi, E.; Piovesan, A. C.; Birolini, C.; Lucon, A. M., Is polypropylene mesh safe and effective for repairing infected incisional hernia in renal transplant recipients? *Urology* **2005**, *66* (4), 874-877.
27. Baino, F., Biomaterials and implants for orbital floor repair. *Acta Biomaterialia* **2011**, *7* (9), 3248-3266.
28. Liu, R.; Kwok, Y.-L.; Li, Y.; Lao, T.-T.; Zhang, X., Effects of material properties and fabric structure characteristics of graduated compression stockings (GCS) on the skin pressure distributions. *Fibers Polym* **2005**, *6* (4), 322-331.
29. Hoon, J. L.; Cassill, N., Analysis of world nonwovens market. *Journal of Textile and Apparel, Technology and Management* **2006**, *5* (3).
30. http://www2.dupont.com/Phoenix_Heritage/en_US/1950_detail.html.
31. GFP, *Initiation à la chimie et à la physico-chimie macromoléculaire: Quelques grands polymères industriels*. GFP: 1988.
32. Kunze, B.; Baumeister, M., Modern spunlaid technology. *Industrial Fabrics Bulletin* **2003**, *13* (3), 30-32.
33. Dhahri, M.; Abed, A.; Lajimi, R. H.; Mansour, M. B.; Gueguen, V.; Abdeselem, S. B.; Chaubet, F.; Letourneur, D.; Meddahi-Pellé, A.; Maaroufi, R. M., Grafting of dermatan sulfate on polyethylene terephthalate to enhance biointegration. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **2011**, *98 A* (1), 114-121.

34. Saito, T.; Takemoto, M.; Fukuda, A.; Kuroda, Y.; Fujibayashi, S.; Neo, M.; Honjoh, D.; Hiraide, T.; Kizuki, T.; Kokubo, T.; Nakamura, T., Effect of titania-based surface modification of polyethylene terephthalate on bone-implant bonding and peri-implant tissue reaction. *Acta Biomaterialia* **2011**, *7* (4), 1558-1569.
35. Franklin, J. E.; Marler, J. J.; Byrne, M. T.; Melvin, A. J.; Clarkson, S. J.; Melvin, D. B., Fiber technology for reliable repair of skeletal muscle. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* **2009**, *90B* (1), 259-266.
36. Franz, S.; Rammelt, S.; Scharnweber, D.; Simon, J. C., Immune responses to implants - A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials* **2011**, *32* (28), 6692-6709.
37. Bryers, J. D., Medical biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *100* (1), 1-18.
38. Harris, L. G.; El-Bouri, K.; Johnston, S.; Rees, E.; Frommelt, L.; Siemssen, N.; Christner, M.; Davies, A. P.; Rohde, H.; Mack, D., Rapid identification of staphylococci from prosthetic joint infections using MALDI-TOF mass-spectrometry. *International Journal of Artificial Organs* **2010**, *33* (9), 568-574.
39. Rodrigues, L. R., Inhibition of bacterial adhesion on medical devices. 2011; Vol. 715, pp 351-367.
40. Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Greenberg, E. P., Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* **1999**, *284* (5418), 1318-1322.
41. Lopez-Lopez, G.; Pascual, A.; Perea, E. J., Effect of plastic catheter material on bacterial adherence and viability. *J. Med. Microbiol.* **1991**, *34* (6), 349-353.
42. Vartiainen, J.; Rättö, M.; Paulussen, S., Antimicrobial activity of glucose oxidase-immobilized plasma-activated polypropylene films. *Packaging Technology and Science* **2005**, *18* (5), 243-251.
43. Appendini, P.; Hotchkiss, J. H., Surface modification of poly(styrene) by the attachment of an antimicrobial peptide. *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, *81* (3), 609-616.
44. Huh, M. W.; Kang, I.-K.; Lee, D. H.; Kim, W. S.; Lee, D. H.; Park, L. S.; Min, K. E.; Seo, K. H., Surface characterization and antibacterial activity of chitosan-grafted poly(ethylene terephthalate) prepared by plasma glow discharge. *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, *81* (11), 2769-2778.
45. Cen, L.; Neoh, K. G.; Kang, E. T., Surface Functionalization Technique for Conferring Antibacterial Properties to Polymeric and Cellulosic Surfaces. *Langmuir* **2003**, *19* (24), 10295-10303.
46. Goddard, J. M.; Hotchkiss, J. H., Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32* (7), 698-725.
47. Kim, Y. J.; Kang, I.-K.; Huh, M. W.; Yoon, S.-C., Surface characterization and in vitro blood compatibility of poly(ethylene terephthalate) immobilized with insulin and/or heparin using plasma glow discharge. *Biomaterials* **2000**, *21* (2), 121-130.

48. Crafoord, C.; Jorpes, E., Heparin as a prophylactic against thrombosis. *Journal of the American Medical Association* **1941**, *116* (26), 2831-2835.
49. Serruys, P. W.; Emanuelsson, H.; van der Giessen, W.; Lunn, A. C.; Kiemeneij, F.; Macaya, C.; Rutsch, W.; Heyndrickx, G.; Suryapranata, H.; Legrand, V.; Goy, J. J.; Materne, P.; Bonnier, H.; Morice, M.-C.; Fajadet, J.; Belardi, J.; Colombo, A.; Garcia, E.; Ruygrok, P.; de Jaegere, P.; Morel, M.-A.; Group, o. b. o. t. B.-I. S., Heparin-Coated Palmaz-Schatz Stents in Human Coronary Arteries: Early Outcome of the Benestent-II Pilot Study. *Circulation* **1996**, *93* (3), 412-422.
50. Weber, N.; Wendel, H. P.; Ziemer, G., Hemocompatibility of heparin-coated surfaces and the role of selective plasma protein adsorption. *Biomaterials* **2002**, *23* (2), 429-439.
51. Habash, M.; Reid, G., Microbial biofilms: their development and significance for medical device-related infections. *The Journal of Clinical Pharmacology* **1999**, *39* (9), 887-898.
52. Blanchemain, N.; Karrout, Y.; Tabary, N.; Neut, C.; Bria, M.; Siepmann, J.; Hildebrand, H. F.; Martel, B., Methyl- β -cyclodextrin modified vascular prosthesis: Influence of the modification level on the drug delivery properties in different media. *Acta Biomaterialia* **2011**, *7* (1), 304-314.
53. Zilberman, M.; Elsner, J. J., Antibiotic-eluting medical devices for various applications. *J. Controlled Release* **2008**, *130* (3), 202-215.
54. Jaskari, T.; Vuorio, M.; Kontturi, K.; Manzanares, J. A.; Hirvonen, J., Ion-exchange fibers and drugs: An equilibrium study. *J. Controlled Release* **2001**, *70* (1-2), 219-229.
55. Suzuki, Y.; Nishimura, Y.; Tanihara, M.; Suzuki, K.; Kakimaru, Y.; Shimizu, Y., A novel wound dressing with antibiotic delivery system stimulated by microbial infection. *ASAIO Journal* **1997**, *43* (2), 86.
56. Suzuki, Y.; Tanihara, M.; Nishimura, Y.; Suzuki, K.; Kakimaru, Y.; Shimizu, Y., A new drug delivery system with controlled release of antibiotic only in the presence of infection. *Journal of Biomedical Materials Research* **1998**, *42* (1), 112-116.
57. Huang, Z.-M.; He, C.-L.; Yang, A.; Zhang, Y.; Han, X.-J.; Yin, J.; Wu, Q., Encapsulating drugs in biodegradable ultrafine fibers through co-axial electrospinning. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2006**, *77A* (1), 169-179.
58. Kumari, A.; Yadav, S. K.; Yadav, S. C., Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010**, *75* (1), 1-18.
59. Rai, M.; Yadav, A.; Gade, A., Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* **2009**, *27* (1), 76-83.
60. Maneerung, T.; Tokura, S.; Rujiravanit, R., Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *72* (1), 43-51.
61. Jones, S.; Bowler, P. G.; Walker, M., Antimicrobial activity of silver-containing dressings is influenced by dressing conformability with a wound surface. *Wounds* **2005**, *17* (9), 263-270.

62. Van Laarhoven, J. A. H.; Kruff, M. A. B.; Vromans, H., *In vitro release properties of etonogestrel and ethinyl estradiol from a contraceptive vaginal ring*. Elsevier: 2002; Vol. 232.
63. Polacco, G.; Cascone, M. G.; Lazzeri, L.; Ferrara, S.; Giusti, P., Biodegradable hollow fibres containing drug-loaded nanoparticles as controlled release systems. *Polym. Int.* **2002**, *51* (12), 1464-1472.
64. Katti, D. S.; Robinson, K. W.; Ko, F. K.; Laurencin, C. T., Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: Optimization of fabrication parameters. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2004**, *70B* (2), 286-296.
65. García-González, C. A.; Alnaief, M.; Smirnova, I., Polysaccharide-based aerogels - Promising biodegradable carriers for drug delivery systems. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *86* (4), 1425-1438.
66. Elsner, J. J.; Shefy-Peleg, A.; Zilberman, M., Novel biodegradable composite wound dressings with controlled release of antibiotics: Microstructure, mechanical and physical properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2010**, *93B* (2), 425-435.
67. Porté, T.; Faschingbauer, M.; Seide, K.; Jürgens, C., Topkin®—Eine resorbierbare Folie aus Lactid-Caprolacton. *Trauma Berufskrankh* **2003**, *5* (4), 443-448.
68. ten Breteler, M. R.; Nierstrasz, V. A.; Warmoeskerken, M. M. C. G., Textile slow-release systems with medical applications. *Autex Research Journal* **2002**, *2* (4), 175-189.
69. Loftsson, T.; Brewster, M. E., Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85* (10), 1017-1025.
70. Connors, K. A., The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **1997**, *97* (5), 1325-1358.
71. Szejtli, J., Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (5), 1743-1754.
72. Mocanu, G.; Vizitiu, D.; Carpov, A., Cyclodextrin polymers. *J. Bioact. Compat. Polym.* **2001**, *16* (4), 315-342.
73. Uekama, K.; Hirayama, F.; Irie, T., Cyclodextrin Drug Carrier Systems. *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **1998**, *98* (5), 2045-2076.
74. Li, J.; Xiao, H.; Li, J.; Zhong, Y., Drug carrier systems based on water-soluble cationic [beta]-cyclodextrin polymers. *Int. J. Pharm.* **2004**, *278* (2), 329-342.
75. Rajewski, R. A.; Stella, V. J., Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85* (11), 1142-1169.
76. Sun, T.; Guo, Q.; Zhang, C.; Hao, J.; Xing, P.; Su, J.; Li, S.; Hao, A.; Liu, G., Self-assembled vesicles prepared from amphiphilic cyclodextrins as drug carriers. *Langmuir* **2012**, *28* (23), 8625-8636.

77. Bellringer, M. E.; Smith, T. G.; Read, R.; Gopinath, C.; Olivier, P., β -Cyclodextrin: 52-Week toxicity studies in the rat and dog. *Food Chem. Toxicol.* **1995**, *33* (5), 367-376.
78. Lina, B. A. R.; Bär, A., Subchronic oral toxicity studies with α -cyclodextrin in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2004**, *39*, Supplement 1 (0), 14-26.
79. <http://www.pierre-fabre.com/fr/glossaire-medicaments/brexin>.
80. Buschmann, H. J.; Knittel, D.; Schollmeyer, E., New Textile Applications of Cyclodextrins. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2001**, *40* (3), 169-172.
81. Bhaskara-Amrit, U. R.; Agrawal, P. B.; Warmoeskerken, M. M. C. G., Applications of β -cyclodextrins in textiles. *AUTEX Research Journal*, **2011**, *11* (N°4), 94-101.
82. Szejtli, J.; Zsardon, B.; Fenyvesi, E.; Horvath, N.; Otta, K.; Tuedoes, F. Sorbents of cellulose basis capable of forming inclusion complexes and a process for the preparation thereof 1982.
83. Uyar, T.; Besenbacher, F., Electrospinning of cyclodextrin functionalized polyethylene oxide (PEO) nanofibers. *Eur. Polym. J.* **2009**, *45* (4), 1032-1037.
84. Uyar, T.; Havelund, R.; Nur, Y.; Hacaloglu, J.; Besenbacher, F.; Kingshott, P., Molecular filters based on cyclodextrin functionalized electrospun fibers. *J. Membr. Sci.* **2009**, *332* (1–2), 129-137.
85. Le Thuaut, P.; Martel, B.; Crini, G.; Maschke, U.; Coqueret, X.; Morcellet, M., Grafting of cyclodextrins onto polypropylene nonwoven fabrics for the manufacture of reactive filters. I. Synthesis parameters. *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, *77* (10), 2118-2125.
86. Martel, B.; Morcellet, M.; Ruffin, D.; Ducoroy, L.; Weltrowski, M., Finishing of polyester fabrics with cyclodextrins and polycarboxylic acids as crosslinking agents. *Journal of Inclusion Phenomena* **2002**, *44* (1-4), 443-446.
87. Martel, B.; Weltrowski, M.; Ruffin, D.; Morcellet, M., Polycarboxylic acids as crosslinking agents for grafting cyclodextrins onto cotton and wool fabrics: Study of the process parameters. *J. Appl. Polym. Sci.* **2002**, *83* (7), 1449-1456.
88. Ducoroy, L.; Martel, B.; Bacquet, M.; Morcellet, M., Cation exchange finishing of nonwoven polyester with polycarboxylic acids and cyclodextrins. *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, *103* (6), 3730-3738.
89. Leprêtre, S.; Chai, F.; Hornez, J. C.; Vermet, G.; Neut, C.; Descamps, M.; Hildebrand, H. F.; Martel, B., Prolonged local antibiotics delivery from hydroxyapatite functionalised with cyclodextrin polymers. *Biomaterials* **2009**, *30* (30), 6086-6093.
90. Boschini, F.; Blanchemain, N.; Bria, M.; Delcourt-Debruyne, E.; Morcellet, M.; Hildebrand, H. F.; Martel, B., Improved drug delivery properties of PVDF membranes functionalized with β -cyclodextrin—Application to guided tissue regeneration in periodontology. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2006**, *79A* (1), 78-85.
91. Leprêtre, S.; Boschini, F.; Tabary, N.; Bria, M.; Martel, B.; Blanchemain, N.; Hildebrand, H.; Morcellet, M.; Delcourt-Debruyne, E., Guided tissue regeneration membranes with controlled

- delivery properties of chlorhexidine by their functionalization with cyclodextrins. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2007**, *57* (1), 297-302.
92. Tabary, N.; Lepretre, S.; Boschini, F.; Blanchemain, N.; Neut, C.; Delcourt-Debruyne, E.; Martel, B.; Morcellet, M.; Hildebrand, H. F., Functionalization of PVDF membranes with carbohydrate derivatives for the controlled delivery of chlorhexidin. *Biomol. Eng.* **2007**, *24* (5), 472-476.
93. Blanchemain, N.; Haulon, S.; Martel, B.; Traisnel, M.; Morcellet, M.; Hildebrand, H. F., Vascular PET Prostheses Surface Modification with Cyclodextrin Coating: Development of a New Drug Delivery System. *Eur J Vasc Endovasc Surg* **2005**, *29* (6), 628-632.
94. Blanchemain, N.; Haulon, S.; Boschini, F.; Traisnel, M.; Morcellet, M.; Martel, B.; Hildebrand, H. F., Vascular prostheses with controlled release of antibiotics: Part 2. In vitro biological evaluation of vascular prostheses treated by cyclodextrins. *Biomol. Eng.* **2007**, *24* (1), 143-148.
95. Blanchemain, N.; Laurent, T.; Haulon, S.; Traisnel, M.; Neut, C.; Kirkpatrick, J.; Morcellet, M.; Hildebrand, H.; Martel, B., In vitro study of a HP γ -cyclodextrin grafted PET vascular prosthesis for application as anti-infectious drug delivery system. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2007**, *57* (1), 675-681.
96. El Ghouli, Y.; Blanchemain, N.; Laurent, T.; Campagne, C.; El Achari, A.; Roudesli, S.; Morcellet, M.; Martel, B.; Hildebrand, H. F., Chemical, biological and microbiological evaluation of cyclodextrin finished polyamide inguinal meshes. *Acta Biomaterialia* **2008**, *4* (5), 1392-1400.
97. Laurent, T.; Kacem, I.; Blanchemain, N.; Cazaux, F.; Neut, C.; Hildebrand, H. F.; Martel, B., Cyclodextrin and maltodextrin finishing of a polypropylene abdominal wall implant for the prolonged delivery of ciprofloxacin. *Acta Biomaterialia* **2011**, *7* (8), 3141-3149.
98. Bigi, A.; Cojazzi, G.; Panzavolta, S.; Roveri, N.; Rubini, K., Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials* **2002**, *23* (24), 4827-4832.
99. Blanchemain, N.; Karrout, Y.; Tabary, N.; Bria, M.; Neut, C.; Hildebrand, H. F.; Siepmann, J.; Martel, B., Comparative study of vascular prostheses coated with polycyclodextrins for controlled ciprofloxacin release. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *90* (4), 1695-1703.
100. Gold, H. S.; Moellering, R. C., Antimicrobial-Drug Resistance. *N. Engl. J. Med.* **1996**, *335* (19), 1445-1453.
101. Zasadzinski, J.; Viswanathan, R.; Madsen, L.; Garnæs, J.; Schwartz, D., Langmuir-Blodgett films. *Science* **1994**, *263* (5154), 1726-1733.
102. Decher, G.; Hong, J. D.; Schmitt, J., Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films* **1992**, *210-211*, Part 2 (0), 831-835.
103. Decher, G., Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science* **1997**, *277* (5330), 1232-1237.

104. Chen, W.; McCarthy, T. J., Layer-by-Layer Deposition: A Tool for Polymer Surface Modification. *Macromolecules* **1997**, *30* (1), 78-86.
105. Decher, G.; Schmitt, J., Fine-Tuning of the film thickness of ultrathin multilayer films composed of consecutively alternating layers of anionic and cationic polyelectrolytes
In *Trends in Colloid and Interface Science VI*, Helm, C.; Lösche, M.; Möhwald, H., Eds. Springer Berlin / Heidelberg: 1992; Vol. 89, pp 160-164.
106. Lvov, Y.; Decher, G.; Moehwald, H., Assembly, structural characterization, and thermal behavior of layer-by-layer deposited ultrathin films of poly(vinyl sulfate) and poly(allylamine). *Langmuir* **1993**, *9* (2), 481-486.
107. Wang, Q.; Hauser, P., New characterization of layer-by-layer self-assembly deposition of polyelectrolytes on cotton fabric. *Cellulose* **2009**, *16* (6), 1123-1131.
108. Karimpil, J. J.; Melo, J. S.; D'Souza, S. F., Immobilization of lipase on cotton cloth using the layer-by-layer self-assembly technique. *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *50* (1), 300-302.
109. Deng, H.; Zhou, X.; Wang, X.; Zhang, C.; Ding, B.; Zhang, Q.; Du, Y., Layer-by-layer structured polysaccharides film-coated cellulose nanofibrous mats for cell culture. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *80* (2), 475-480.
110. Ladam, G.; Schaad, P.; Voegel, J. C.; Schaaf, P.; Decher, G.; Cuisinier, F., In situ determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* **2000**, *16* (3), 1249-1255.
111. Irigoyen, J.; Moya, S. E.; Iturri, J. J.; Llarena, I.; Azzaroni, O.; Donath, E., Specific ζ -potential response of layer-by-layer coated colloidal particles triggered by polyelectrolyte ion interactions. *Langmuir* **2009**, *25* (6), 3374-3380.
112. Hoogeveen, N. G.; Cohen Stuart, M. A.; Fleer, G. J.; Böhmer, M. R., Formation and stability of multilayers of polyelectrolytes. *Langmuir* **1996**, *12* (15), 3675-3681.
113. Sukhishvili, S. A.; Granick, S., Polyelectrolyte adsorption onto an initially-bare solid surface of opposite electrical charge. *J. Chem. Phys.* **1998**, *109* (16), 6861-6868.
114. Wang, L.; Cui, S.; Wang, Z.; Zhang, X.; Jiang, M.; Chi, L.; Fuchs, H., Multilayer assemblies of copolymer PSOH and PVP on the basis of hydrogen bonding. *Langmuir* **2000**, *16* (26), 10490-10494.
115. Cochin, D.; Laschewsky, A., Layer-by-layer self-assembly of hydrophobically modified polyelectrolytes. *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, *200* (3), 609-615.
116. Delcorte, A.; Bertrand, P.; Wischerhoff, E.; Laschewsky, A., *Adsorption of polyelectrolyte multilayers on polymer surfaces*. American Chemical Society: 1997; Vol. 13.
117. Seantier, B. A.; Deratani, A., *Ionic interactions in natural and synthetic macromolecules*. first ed. Ed. A. Ciferri, A. Perico ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, N.J., 2012.

118. Schmitt, J.; Grünewald, T.; Decher, G.; Pershan, P. S.; Kjaer, K.; Lösche, M., Internal structure of layer-by-layer adsorbed polyelectrolyte films: A neutron and X-ray reflectivity study. *Macromolecules* **1993**, *26* (25), 7058-7063.
119. Kharlampieva, E.; Kozlovskaya, V.; Chan, J.; Ankner, J. F.; Tsukruk, V. V., Spin-assisted layer-by-layer assembly: Variation of stratification as studied with neutron reflectivity. *Langmuir* **2009**, *25* (24), 14017-14024.
120. Mitzi, D. B.; Kosbar, L. L.; Murray, C. E.; Copel, M.; Afzali, A., High-mobility ultrathin semiconducting films prepared by spin coating. *Nature* **2004**, *428* (6980), 299-303.
121. Chiarelli, P. A.; Johal, M. S.; Casson, J. L.; Roberts, J. B.; Robinson, J. M.; Wang, H. L., Controlled fabrication of polyelectrolyte multilayer thin films using spin-assembly. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **2001**, *13* (15), 1167-1171.
122. Schlenoff, J. B.; Dubas, S. T.; Farhat, T., Sprayed polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* **2000**, *16* (26), 9968-9969.
123. Krogman, K. C.; Lyon, K. F.; Hammond, P. T., Metal ion reactive thin films using spray electrostatic LbL assembly. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (46), 14453-14460.
124. Porcel, C.; Lavalle, P.; Ball, V.; Decher, G.; Senger, B.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P., From Exponential to Linear Growth in Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir* **2006**, *22* (9), 4376-4383.
125. Richert, L.; Lavalle, P.; Payan, E.; Shu, X. Z.; Prestwich, G. D.; Stoltz, J.-F.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Picart, C., Layer by Layer Buildup of Polysaccharide Films: Physical Chemistry and Cellular Adhesion Aspects. *Langmuir* **2003**, *20* (2), 448-458.
126. Lavalle, P.; Gergely, C.; Cuisinier, F. J. G.; Decher, G.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Picart, C., Comparison of the Structure of Polyelectrolyte Multilayer Films Exhibiting a Linear and an Exponential Growth Regime: An in Situ Atomic Force Microscopy Study. *Macromolecules* **2002**, *35* (11), 4458-4465.
127. Hübsch, E.; Ball, V.; Senger, B.; Decher, G.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P., Controlling the Growth Regime of Polyelectrolyte Multilayer Films: Changing from Exponential to Linear Growth by Adjusting the Composition of Polyelectrolyte Mixtures. *Langmuir* **2004**, *20* (5), 1980-1985.
128. Salomäki, M.; Vinokurov, I. A.; Kankare, J., Effect of temperature on the buildup of polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* **2005**, *21* (24), 11232-11240.
129. Burke, S. E.; Barrett, C. J., pH-responsive properties of multilayered poly(L-lysine)/hyaluronic acid surfaces. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (6), 1773-1783.
130. Fu, J.; Ji, J.; Yuan, W.; Shen, J., Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan. *Biomaterials* **2005**, *26* (33), 6684-6692.

131. Yoo, D.; Shiratori, S. S.; Rubner, M. F., Controlling bilayer composition and surface wettability of sequentially adsorbed multilayers of weak polyelectrolytes. *Macromolecules* **1998**, *31* (13), 4309-4318.
132. Shiratori, S. S.; Rubner, M. F., pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes. *Macromolecules* **2000**, *33* (11), 4213-4219.
133. Porcel, C.; Lavallo, P.; Decher, G.; Senger, B.; Voegel, J. C.; Schaaf, P., Influence of the Polyelectrolyte Molecular Weight on Exponentially Growing Multilayer Films in the Linear Regime. *Langmuir* **2007**, *23* (4), 1898-1904.
134. Dubas, S. T.; Schlenoff, J. B., Polyelectrolyte Multilayers Containing a Weak Polyacid: Construction and Deconstruction. *Macromolecules* **2001**, *34* (11), 3736-3740.
135. Tryoen-Tóth, P.; Vautier, D.; Haikel, Y.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P.; Chluba, J.; Ogier, J., Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films. *Journal of Biomedical Materials Research* **2002**, *60* (4), 657-667.
136. Etienne, O.; Schneider, A.; Taddei, C.; Richert, L.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Egles, C.; Picart, C., Degradability of polysaccharides multilayer films in the oral environment: An in vitro and in vivo study. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (2), 726-733.
137. Guillaume-Gentil, O.; Graf, N.; Boulmedais, F.; Schaaf, P.; Voros, J.; Zambelli, T., Global and local view on the electrochemically induced degradation of polyelectrolyte multilayers: from dissolution to delamination. *Soft Matter* **2010**, *6* (17), 4246-4254.
138. Schüler, C.; Caruso, F., Decomposable hollow biopolymer-based capsules. *Biomacromolecules* **2001**, *2* (3), 921-926.
139. Köstler, S.; Ribitsch, V.; Stana-Kleinschek, K.; Jakopic, G.; Strnad, S., Electrokinetic investigation of polyelectrolyte adsorption and multilayer formation on a polymer surface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2005**, *270-271* (1-3), 107-114.
140. Hong, H.; Steitz, R.; Kirstein, S.; Davidov, D., Superlattice Structures in Poly(phenylenevinylene)-Based Self-Assembled Films. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **1998**, *10* (14), 1104-1108.
141. Hong, J.; Alvarez, L.; Shah, N.; Cho, Y.; Kim, B.-S.; Griffith, L.; Char, K.; Hammond, P., Multilayer thin-film coatings capable of extended programmable drug release: application to human mesenchymal stem cell differentiation. *Drug Deliv. and Transl. Res.* **2012**, *2* (5), 375-383.
142. Richert, L.; Engler, A. J.; Discher, D. E.; Picart, C., Elasticity of native and cross-linked polyelectrolyte multilayer films. *Biomacromolecules* **2004**, *5* (5), 1908-1916.
143. Richert, L.; Boulmedais, F.; Lavallo, P.; Mutterer, J.; Ferreux, E.; Decher, G.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Picart, C., Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-linking. *Biomacromolecules* **2004**, *5* (2), 284-294.

144. Hillberg, A. L.; Holmes, C. A.; Tabrizian, M., Effect of genipin cross-linking on the cellular adhesion properties of layer-by-layer assembled polyelectrolyte films. *Biomaterials* **2009**, *30* (27), 4463-4470.
145. Schneider, A.; Richert, L.; Francius, G.; Voegel, J. C.; Picart, C., Elasticity, biodegradability and cell adhesive properties of chitosan/hyaluronan multilayer films. *Biomedical Materials* **2007**, *2* (1), S45-S51.
146. Harris, J. J.; DeRose, P. M.; Bruening, M. L., Synthesis of passivating, nylon-like coatings through cross-linking of ultrathin polyelectrolyte films [13]. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (9), 1978-1979.
147. Mendelsohn, J. D.; Yang, S. Y.; Hiller, J. A.; Hochbaum, A. I.; Rubner, M. F., Rational design of cytophilic and cytophobic polyelectrolyte multilayer thin films. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (1), 96-106.
148. Brynda, E.; Houska, M., Multiple alternating molecular layers of albumin and heparin on solid surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *183* (1), 18-25.
149. Schuetz, P.; Caruso, F., Copper-Assisted Weak Polyelectrolyte Multilayer Formation on Microspheres and Subsequent Film Crosslinking. *Adv. Funct. Mater.* **2003**, *13* (12), 929-937.
150. Vázquez, C. P.; Boudou, T.; Dulong, V.; Nicolas, C.; Picart, C.; Glinel, K., Variation of polyelectrolyte film stiffness by photo-cross-linking: A new way to control cell adhesion. *Langmuir* **2009**, *25* (6), 3556-3563.
151. Park, M. K.; Deng, S.; Advincula, R. C., Sustained release control via photo-cross-linking of polyelectrolyte layer-by-layer hollow capsules. *Langmuir* **2005**, *21* (12), 5272-5277.
152. Chaubaroux, C.; Vrana, E.; Debry, C.; Schaaf, P.; Senger, B.; Voegel, J. C.; Haikel, Y.; Ringwald, C.; Hemmerlé, J.; Lavallo, P.; Boulmedais, F., Collagen-based fibrillar multilayer films cross-linked by a natural agent. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (7), 2128-2135.
153. Moffat, K. L.; Marra, K. G., Biodegradable poly(ethylene glycol) hydrogels crosslinked with genipin for tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2004**, *71B* (1), 181-187.
154. Wang, C.; Lau, T. T.; Loh, W. L.; Su, K.; Wang, D.-A., Cytocompatibility study of a natural biomaterial crosslinker—Genipin with therapeutic model cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2011**, *97B* (1), 58-65.
155. Lee, S.-W.; Lim, J.-M.; Bhoo, S.-H.; Paik, Y.-S.; Hahn, T.-R., Colorimetric determination of amino acids using genipin from *Gardenia jasminoides*. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *480* (2), 267-274.
156. Butler, M. F.; Ng, Y.-F.; Pudney, P. D. A., Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2003**, *41* (24), 3941-3953.

157. Mi, F.-L.; Shyu, S.-S.; Peng, C.-K., Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2005**, *43* (10), 1985-2000.
158. Chiono, V.; Pulieri, E.; Vozi, G.; Ciardelli, G.; Ahluwalia, A.; Giusti, P., Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2008**, *19* (2), 889-898.
159. Caruso, F.; Niikura, K.; Furlong, D. N.; Okahata, Y., 2. Assembly of alternating polyelectrolyte and protein multilayer films for imminosensing. *Langmuir* **1997**, *13* (13), 3427-3433.
160. Brunot, C.; Grosgeat, B.; Picart, C.; Lagneau, C.; Jaffrezic-Renault, N.; Ponsonnet, L., Response of fibroblast activity and polyelectrolyte multilayer films coating titanium. *Dental Materials* **2008**, *24* (8), 1025-1035.
161. Stevens, M. M.; George, J. H., Exploring and engineering the cell surface interface. *Science* **2005**, *310* (5751), 1135-1138.
162. Hajicharalambous, C. S.; Lichter, J.; Hix, W. T.; Swierczewska, M.; Rubner, M. F.; Rajagopalan, P., Nano- and sub-micron porous polyelectrolyte multilayer assemblies: Biomimetic surfaces for human corneal epithelial cells. *Biomaterials* **2009**, *30* (23–24), 4029-4036.
163. Mendelsohn, J. D.; Barrett, C. J.; Chan, V. V.; Pal, A. J.; Mayes, A. M.; Rubner, M. F., Fabrication of microporous thin films from polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* **2000**, *16* (11), 5017-5023.
164. Chua, P. H.; Neoh, K. G.; Kang, E. T.; Wang, W., Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion. *Biomaterials* **2008**, *29* (10), 1412-1421.
165. Harnet, J. C.; Le Guen, E.; Ball, V.; Tenenbaum, H.; Ogier, J.; Haikel, Y.; Vodouhê, C., Antibacterial protection of suture material by chlorhexidine-functionalized polyelectrolyte multilayer films. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2009**, *20* (1), 185-193.
166. Thierry, B.; Winnik, F. M.; Merhi, Y.; Silver, J.; Tabrizian, M., Bioactive coatings of endovascular stents based on polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (6), 1564-1571.
167. Meng, S.; Liu, Z.; Shen, L.; Guo, Z.; Chou, L. L.; Zhong, W.; Du, Q.; Ge, J., The effect of a layer-by-layer chitosan–heparin coating on the endothelialization and coagulation properties of a coronary stent system. *Biomaterials* **2009**, *30* (12), 2276-2283.
168. Song, Z.; Yin, J.; Luo, K.; Zheng, Y.; Yang, Y.; Li, Q.; Yan, S.; Chen, X., Layer-by-Layer buildup of Poly(L-glutamic acid)/Chitosan film for biologically active coating. *Macromol. Biosci.* **2009**, *9* (3), 268-278.
169. Serizawa, T.; Yamaguchi, M.; Akashi, M., Enzymatic Hydrolysis of a Layer-by-Layer Assembly Prepared from Chitosan and Dextran Sulfate. *Macromolecules* **2002**, *35* (23), 8656-8658.

170. Serizawa, T.; Yamaguchi, M.; Akashi, M., Alternating bioactivity of polymeric layer-by-layer assemblies: Anticoagulation vs procoagulation of human blood. *Biomacromolecules* **2002**, *3* (4), 724-731.
171. Zhou, J.; Romero, G.; Rojas, E.; Lie, M.; Moya, S.; Changyou, G., Layer by layer chitosan/alginate coatings on poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for antifouling protection and Folic acid binding to achieve selective cell targeting. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *345* (2), 241-247.
172. Sperling, C.; Houska, M.; Brynda, E.; Streller, U.; Werner, C., In vitro hemocompatibility of albumin-heparin multilayer coatings on polyethersulfone prepared by the layer-by-layer technique. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **2006**, *76* (4), 681-689.
173. Hwang, J. J.; Jelacic, S.; Samuel, N. T.; Maier, R. V.; Campbell, C. T.; Castner, D. G.; Hoffman, A. S.; Stayton, P. S., Monocyte activation on polyelectrolyte multilayers. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **2005**, *16* (2), 237-251.
174. Elbert, D. L.; Herbert, C. B.; Hubbell, J. A., Thin Polymer Layers Formed by Polyelectrolyte Multilayer Techniques on Biological Surfaces. *Langmuir* **1999**, *15* (16), 5355-5362.
175. Richert, L.; Arntz, Y.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Picart, C., pH dependent growth of poly(L-lysine)/poly(L-glutamic) acid multilayer films and their cell adhesion properties. *Surf. Sci.* **2004**, *570* (1-2), 13-29.
176. Werner, S.; Huck, O.; Frisch, B.; Vautier, D.; Elkaim, R.; Voegel, J. C.; Brunel, G.; Tenenbaum, H., The effect of microstructured surfaces and laminin-derived peptide coatings on soft tissue interactions with titanium dental implants. *Biomaterials* **2009**, *30* (12), 2291-2301.
177. Crouzier, T.; Ren, K.; Nicolas, C.; Roy, C.; Picart, C., Layer-by-layer films as a biomimetic reservoir for rhBMP-2 delivery: Controlled differentiation of myoblasts to osteoblasts. *Small* **2009**, *5* (5), 598-608.
178. Benkirane-Jessel, N.; Schwinté, P.; Falvey, P.; Darcy, R.; Haïkel, Y.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Ogier, J., Build-up of Polypeptide Multilayer Coatings with Anti-Inflammatory Properties Based on the Embedding of Piroxicam-Cyclodextrin Complexes. *Adv. Funct. Mater.* **2004**, *14* (2), 174-182.
179. Daubiné, F.; Cortial, D.; Ladam, G.; Atmani, H.; Haïkel, Y.; Voegel, J. C.; Clézardin, P.; Benkirane-Jessel, N., Nanostructured polyelectrolyte multilayer drug delivery systems for bone metastasis prevention. *Biomaterials* **2009**, *30* (31), 6367-6373.
180. Gribova, V.; Auzely-Velty, R.; Picart, C., Polyelectrolyte Multilayer Assemblies on Materials Surfaces: From Cell Adhesion to Tissue Engineering. *Chem. Mater.* **2011**, *24* (5), 854-869.
181. Chen, J.; Chen, C.; Chen, Z.; Li, Q.; Huang, N., Collagen/heparin coating on titanium surface improves the biocompatibility of titanium applied as a blood-contacting biomaterial. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **2010**, *95 A* (2), 341-349.

182. Brunot, C.; Ponsonnet, L.; Lagneau, C.; Farge, P.; Picart, C.; Grosogeat, B., Cytotoxicity of polyethyleneimine (PEI), precursor base layer of polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials* **2007**, *28* (4), 632-640.
183. Fischer, D.; Li, Y.; Ahlemeyer, B.; Kriegelstein, J.; Kissel, T., In vitro cytotoxicity testing of polycations: Influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* **2003**, *24* (7), 1121-1131.
184. Kerdjoudj, H.; Berthelemy, N.; Rinckenbach, S.; Kearney-Schwartz, A.; Montagne, K.; Schaaf, P.; Lacolley, P.; Stoltz, J. F.; Voegel, J. C.; Menu, P., Small Vessel Replacement by Human Umbilical Arteries With Polyelectrolyte Film-Treated Arteries. In Vivo Behavior. *Journal of the American College of Cardiology* **2008**, *52* (19), 1589-1597.
185. Crouzier, T.; Boudou, T.; Picart, C., Polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2010**, *15* (6), 417-426.
186. Lee, D. W.; Lim, H.; Chong, H. N.; Shim, W. S., Advances in chitosan material and its hybrid derivatives: a review. *Open Biomater. J.* **2009**, *1*, 10-20.
187. Boudou, T.; Crouzier, T.; Ren, K.; Blin, G.; Picart, C., Multiple functionalities of polyelectrolyte multilayer films: New biomedical applications. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **2010**, *22* (4), 441-467.
188. Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R. M.; Chiellini, E., Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)* **2011**, *36* (8), 981-1014.
189. Lin, Q. K.; Ren, K. F.; Ji, J., Hyaluronic acid and chitosan-DNA complex multilayered thin film as surface-mediated nonviral gene delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2009**, *74* (1), 298-303.
190. Zheng, L.-Y.; Zhu, J.-F., Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydr. Polym.* **2003**, *54* (4), 527-530.
191. Costa-Júnior, E. S.; Barbosa-Stancioli, E. F.; Mansur, A. A. P.; Vasconcelos, W. L.; Mansur, H. S., Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *76* (3), 472-481.
192. Rinaudo, M., Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)* **2006**, *31* (7), 603-632.
193. Venkatesan, J.; Ryu, B.; Sudha, P. N.; Kim, S. K., Preparation and characterization of chitosan-carbon nanotube scaffolds for bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *50* (2), 393-402.
194. Kim, I.-Y.; Seo, S.-J.; Moon, H.-S.; Yoo, M.-K.; Park, I.-Y.; Kim, B.-C.; Cho, C.-S., Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances* **2008**, *26* (1), 1-21.
195. Ladam, G.; Schaaf, P.; Decher, G.; Voegel, J. C.; Cuisinier, F. J. G., Protein adsorption onto auto-assembled polyelectrolyte films. *Biomol. Eng.* **2002**, *19* (2-6), 273-280.

196. Abdelkebir, K.; Gaudiere, F.; Morin-Grognet, S.; Coquerel, G.; Labat, B.; Atmani, H.; Ladam, G., Evidence of different growth regimes coexisting within biomimetic Layer-by-Layer films. *Soft Matter* **2011**, *7* (19), 9197-9205.
197. Hahn, S. K.; Hoffman, A. S., Preparation and characterization of biocompatible polyelectrolyte complex multilayer of hyaluronic acid and poly-L-lysine. *Int. J. Biol. Macromol.* **2005**, *37* (5), 227-231.
198. Lvov, Y.; Ariga, K.; Ichinose, I.; Kunitake, T., Assembly of multicomponent protein films by means of electrostatic layer-by-layer adsorption. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (22), 6117-6123.
199. Chluba, J.; Voegel, J. C.; Decher, G.; Erbacher, P.; Schaaf, P.; Ogier, J., Peptide hormone covalently bound to polyelectrolytes and embedded into multilayer architectures conserving full biological activity. *Biomacromolecules* **2001**, *2* (3), 800-805.
200. Thierry, B.; Kujawa, P.; Tkaczyk, C.; Winnik, F. M.; Bilodeau, L.; Tabrizian, M., Delivery platform for hydrophobic drugs: Prodrug approach combined with self-assembled multilayers. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (6), 1626-1627.
201. Wittmer, C. R.; Phelps, J. A.; Saltzman, W. M.; Van Tassel, P. R., Fibronectin terminated multilayer films: Protein adsorption and cell attachment studies. *Biomaterials* **2007**, *28* (5), 851-860.
202. Lvov, Y.; Haas, H.; Decher, G.; Möhwald, H.; Mikhailov, A.; Mtchedlishvily, B.; Morgunova, E.; Vainshtein, B., Successive deposition of alternate layers of polyelectrolytes and a charged virus. *Langmuir* **1994**, *10* (11), 4232-4236.
203. Jewell, C. M.; Lynn, D. M., Multilayered polyelectrolyte assemblies as platforms for the delivery of DNA and other nucleic acid-based therapeutics. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60* (9), 979-999.
204. Jewell, C. M.; Zhang, J.; Fredin, N. J.; Wolff, M. R.; Hacker, T. A.; Lynn, D. M., Release of plasmid DNA from intravascular stents coated with ultrathin multilayered polyelectrolyte films. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (9), 2483-2491.
205. Zhang, J.; Lynn, D. M., Ultrathin multilayered films assembled from "charge-shifting" cationic polymers: Extended, long-term release of plasmid DNA from surfaces. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **2007**, *19* (23), 4218-4223.
206. Ren, K.; Ji, J.; Shen, J., Tunable DNA release from cross-linked ultrathin DNA/PLL multilayered films. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17* (1), 77-83.
207. Garza, J. M.; Jessel, N.; Ladam, G.; Dupray, V.; Muller, S.; Stoltz, J. F.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Lavallo, P., Polyelectrolyte multilayers and degradable polymer layers as multicompartiment films. *Langmuir* **2005**, *21* (26), 12372-12377.
208. van den Beucken, J. J. P.; Walboomers, X. F.; Boerman, O. C.; Vos, M. R. J.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Hayakawa, T.; Fukushima, T.; Okahata, Y.; Nolte, R. J. M.; Jansen, J. A., Functionalization of

- multilayered DNA-coatings with bone morphogenetic protein 2. *J. Controlled Release* **2006**, *113* (1), 63-72.
209. Fu, J.; Ji, A.; Fan, D.; Shen, J., Construction of antibacterial multilayer films containing nanosilver via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan-silver ions complex. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **2006**, *79* (3), 665-674.
210. Yu, D.-G.; Lin, W.-C.; Yang, M.-C., Surface Modification of Poly(l-lactic acid) Membrane via Layer-by-Layer Assembly of Silver Nanoparticle-Embedded Polyelectrolyte Multilayer. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18* (5), 1521-1529.
211. Chung, A. J.; Rubner, M. F., Methods of loading and releasing low molecular weight cationic molecules in weak polyelectrolyte multilayer films. *Langmuir* **2002**, *18* (4), 1176-1183.
212. Qi, B.; Tong, X.; Zhao, Y., Layer-by-layer assembly of two different polymer micelles with polycation and polyanion coronas. *Macromolecules* **2006**, *39* (17), 5714-5719.
213. Quinn, J. F.; Caruso, F., Facile Tailoring of Film Morphology and Release Properties Using Layer-by-Layer Assembly of Thermoresponsive Materials. *Langmuir* **2004**, *20* (1), 20-22.
214. Ariga, K.; Lvov, Y. M.; Kawakami, K.; Ji, Q.; Hill, J. P., Layer-by-layer self-assembled shells for drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2011**, *63* (9), 762-771.
215. Agarwal, A.; Lvov, Y.; Sawant, R.; Torchilin, V., Stable nanocolloids of poorly soluble drugs with high drug content prepared using the combination of sonication and layer-by-layer technology. *J. Controlled Release* **2008**, *128* (3), 255-260.
216. Auzély-Velty, R.; Rinaudo, M., Chitosan Derivatives Bearing Pendant Cyclodextrin Cavities: Synthesis and Inclusion Performance. *Macromolecules* **2001**, *34* (11), 3574-3580.
217. Jessel, N.; Oulad-Abdelghani, M.; Meyer, F.; Lavalle, P.; Haïkel, Y.; Schaaf, P.; Voegel, J. C., Multiple and time-scheduled in situ DNA delivery mediated by β -cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (23), 8618-8621.
218. Hu, Y.; Cai, K.; Luo, Z.; Hu, R., Construction of Polyethyleneimine- β -cyclodextrin/pDNA Multilayer Structure for Improved In Situ Gene Transfection. *Advanced Engineering Materials* **2010**, *12* (1-2), B18-B25.
219. Tan, S. C.; Khor, E.; Tan, T. K.; Wong, S. M., The degree of deacetylation of chitosan: Advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. *Talanta* **1998**, *45* (4), 713-719.
220. Kasaai, M. R., A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *71* (4), 497-508.
221. Kasaai, M. R., Various Methods for Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitin and Chitosan: A Review. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (5), 1667-1676.

222. Khan, T. A.; Peh, K. K.; Ch'ng, H. S., Reporting degree of deacetylation values of chitosan: The influence of analytical methods. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2002**, *5* (3), 205-212.
223. Rinaudo, M.; Milas, M.; Dung, P. L., Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *Int. J. Biol. Macromol.* **1993**, *15* (5), 281-285.
224. Martel, B.; Morcellet, M.; Weltrowski, M. Cyclodextrin polymers and/or cyclodextrin derivatives with complexing properties and ion exchange. Properties and method for the production thereof 2002.
225. 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**, *97* (2), 433-442.
226. Blanchemain, N.; Laurent, T.; Chai, F.; Neut, C.; Haulon, S.; Krump-konvalinkova, V.; Morcellet, M.; Martel, B.; Kirkpatrick, C. J.; Hildebrand, H. F., Polyester vascular prostheses coated with a cyclodextrin polymer and activated with antibiotics: Cytotoxicity and microbiological evaluation. *Acta Biomaterialia* **2008**, *4* (6), 1725-1733.
227. Ducoroy, L.; Bacquet, M.; Martel, B.; Morcellet, M., Removal of heavy metals from aqueous media by cation exchange nonwoven PET coated with β -cyclodextrin-polycarboxylic moieties. *Reactive and Functional Polymers* **2008**, *68* (2), 594-600.
228. Atthoff, B.; Hilborn, J., Protein adsorption onto polyester surfaces: Is there a need for surface activation? *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* **2007**, *80* (1), 121-130.
229. Blanchemain, N.; Haulon, S.; Boschini, F.; Marcon-Bachari, E.; Traisnel, M.; Morcellet, M.; Hildebrand, H. F.; Martel, B., Vascular prostheses with controlled release of antibiotics: Part 1: Surface modification with cyclodextrins of PET prostheses. *Biomol. Eng.* **2007**, *24* (1), 149-153.
230. Ducoroy, L. Modification de fibres de polyester pour l'obtention de textiles échangeurs d'ions – Application à la dépollution métallique des eaux. Université de Lille 1, Lille, 2006.
231. Ducoroy, L.; Martel, B.; Bacquet, B.; Morcellet, M., Ion exchange textiles from the finishing of PET fabrics with cyclodextrins and citric acid for the sorption of metallic cations in water. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2007**, *57* (1-4), 271-277.
232. Laurent, T. Imperméabilisation, traitement antiseptique et teinture d'une prothèse vasculaire fonctionnalisée par la cyclodextrine. Université de Lille 1, Lille, 2008.
233. Gray, J. J., The interaction of proteins with solid surfaces. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14* (1), 110-115.
234. Tie, Y.; Calonder, C.; Van Tassel, P. R., Protein adsorption: Kinetics and history dependence. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *268* (1), 1-11.

235. Scott, E. A.; Nichols, M. D.; Cordova, L. H.; George, B. J.; Jun, Y.-S.; Elbert, D. L., Protein adsorption and cell adhesion on nanoscale bioactive coatings formed from poly(ethylene glycol) and albumin microgels. *Biomaterials* **2008**, *29* (34), 4481-4493.
236. Kurrat, R.; Textor, M.; Ramsden, J. J.; Boni, P.; Spencer, N. D., Instrumental improvements in optical waveguide light mode spectroscopy for the study of biomolecule adsorption
Review of Scientific Instruments **1997**, *68* (5), 2172-2176.
237. Kurrat, R.; Prenosil, J. E.; Ramsden, J. J., Kinetics of Human and Bovine Serum Albumin Adsorption at Silica–Titania Surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *185* (1), 1-8.
238. Eggleston, C. M.; Vörös, J.; Shi, L.; Lower, B. H.; Droubay, T. C.; Colberg, P. J. S., Binding and direct electrochemistry of OmcA, an outer-membrane cytochrome from an iron reducing bacterium, with oxide electrodes: A candidate biofuel cell system. *Inorg. Chim. Acta* **2008**, *361* (3), 769-777.
239. Brusatori, M. A.; Van Tassel, P. R., *Biosensing under an applied voltage using optical waveguide lightmode spectroscopy*. Elsevier: Kidlington, ROYAUME-UNI, 2003; Vol. 18, p 9.
240. Tiefenthaler, K.; Lukosz, W., *Sensitivity of grating couplers as integrated-optical chemical sensors*. Optical Society of America: Washington, DC, ETATS-UNIS, 1989; Vol. 6.
241. Vörös, J.; Ramsden, J. J.; Csúcs, G.; Szendrő, I.; De Paul, S. M.; Textor, M.; Spencer, N. D., Optical grating coupler biosensors. *Biomaterials* **2002**, *23* (17), 3699-3710.
242. Picart, C.; Ladam, G.; Senger, B.; Voegel, J. C.; Schaaf, P.; Cuisinier, F. J. G.; Gergely, C., Determination of structural parameters characterizing thin films by optical methods: A comparison between scanning angle reflectometry and optical waveguide lightmode spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **2001**, *115* (2), 1086-1094.
243. Sannomiya, T.; Balmer, T. E.; Heuberger, M.; Vörös, J., Simultaneous Refractive index and thickness Measurement with the transmission interferometric adsorption sensor. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2010**, *43* (40).
244. Picart, C.; Gergely, C.; Arntz, Y.; Voegel, J. C.; Schaaf, P.; Cuisinier, F. J. G.; Senger, B., Measurement of film thickness up to several hundreds of nanometers using optical waveguide lightmode spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics* **2004**, *20* (3), 553-561.
245. Ramsden, J. J., Review of new experimental techniques for investigating random sequential adsorption. *Journal of Statistical Physics* **1993**, *73* (5-6), 853-877.
246. Leclercq, L.; Modena, E.; Vert, M., Adsorption of proteins at physiological concentrations on pegylated surfaces and the compatibilizing role of adsorbed albumin with respect to other proteins according to optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS). *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **2013**, 1-20.

247. Ngankam, A. P.; Van Tassel, P. R., In Situ Layer-by-Layer Film Formation Kinetics under an Applied Voltage Measured by Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy. *Langmuir* **2005**, *21* (13), 5865-5871.
248. Zhen, G.; Egli, V.; Vörös, J.; Zammaretti, P.; Textor, M.; Glockshuber, R.; Kuennemann, E., Immobilization of the Enzyme β -Lactamase on Biotin-Derivatized Poly(l-lysine)-g-poly(ethylene glycol)-Coated Sensor Chips: A Study on Oriented Attachment and Surface Activity by Enzyme Kinetics and in Situ Optical Sensing. *Langmuir* **2004**, *20* (24), 10464-10473.
249. Lu, L.; Yaszemski, M. J.; Mikos, A. G., Retinal pigment epithelium engineering using synthetic biodegradable polymers. *Biomaterials* **2001**, *22* (24), 3345-3355.
250. Weickenmeier, M.; Wenz, G.; Huff, J., Association thickener by host guest interaction of a β -cyclodextrin polymer and a polymer with hydrophobic side-groups. *Macromol. Rapid Commun.* **1997**, *18* (12), 1117-1123.
251. Wenz, G.; Strassnig, C.; Thiele, C.; Engelke, A.; Morgenstern, B.; Hegetschweiler, K., Recognition of Ionic Guests by Ionic β -Cyclodextrin Derivatives. *Chemistry – A European Journal* **2008**, *14* (24), 7202-7211.
252. El-Kemary, M.; Sobhy, S.; El-Daly, S.; Abdel-Shafi, A., Inclusion of Paracetamol into β -cyclodextrin nanocavities in solution and in the solid state. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2011**, *79* (5), 1904-1908.
253. Kaulpiboon, J.; Rudeekulthamrong, P., Effect of temperature on cyclodextrin production and characterization of paracetamol/cyclodextrin complexes. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet* **2010**, *93* Suppl 6, S160-165.
254. Hamai, S.; Satou, H., Inclusion Complexes of Cyclodextrins with Methylene Blue and α -Naphthol Orange and Temperature Dependence of the Inclusion Complexation in Aqueous Solutions. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2002**, *75* (1), 77-84.
255. Zhang, G.; Shuang, S.; Dong, C.; Pan, J., Study on the interaction of methylene blue with cyclodextrin derivatives by absorption and fluorescence spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2003**, *59* (13), 2935-2941.
256. Schirmer, R. H.; Adler, H.; Pickhardt, M.; Mandelkow, E., "Lest we forget you — methylene blue ...". *Neurobiology of Aging* **2011**, *32* (12), 2325.e7-2325.e16.
257. Shao, Y.; Martel, B.; Morcellet, M.; Weltrowski, M., Interactions between β -cyclodextrin and water-soluble dyes. *Canadian Textile Journal* **1996-1997**, 53-58.
258. Seidell, A. I. c. d. R., *Solubilities of inorganic and organic substances a handbook of the most reliable quantitative solubility determinations*. D. Van Nostrand Company: New York, 1917.
259. Scott, R. L., Some comments on the Benesi-Hildebrand equation. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **1956**, *75* (7), 787-789.

260. O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F., Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267* (17), 5421-5426.
261. Hamid, R.; Rotshteyn, Y.; Rabadi, L.; Parikh, R.; Bullock, P., Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicol. in Vitro* **2004**, *18* (5), 703-710.
262. Scott, C. P.; Higham, P. A., Antibiotic bone cement for the treatment of pseudomonas aeruginosa in joint arthroplasty: Comparison of tobramycin and gentamicin-loaded cements. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2003**, *64B* (2), 94-98.
263. Boustta, M.; Leclercq, L.; Vert, M., Affinity chromatography as a tool to analyze polyanion-polycation complexes: The case of poly(L-lysine citramide)-poly(L-lysine) systems. *J. Bioact. Compat. Polym.* **2004**, *19* (3), 155-171.
264. Leclercq, L.; Boustta, M.; Vert, M., Dynamics of polyelectrolyte complex formation and stability when a polycation is progressively added to a polyanion under physico-chemical conditions modeling blood. *J. Bioact. Compat. Polym.* **2011**, *26* (1), 3-19.
265. Leclercq, L.; Cottet, H., Fast characterization of polyelectrolyte complexes by inline coupling of capillary electrophoresis to Taylor dispersion analysis. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (3), 1740-1743.
266. Kujawa, P.; Moraille, P.; Sanchez, J.; Badia, A.; Winnik, F. M., Effect of Molecular Weight on the Exponential Growth and Morphology of Hyaluronan/Chitosan Multilayers: A Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Atomic Force Microscopy Investigation. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (25), 9224-9234.
267. Strydom, S. J.; Otto, D. P.; Liebenberg, W.; Lvov, Y. M.; de Villiers, M. M., Preparation and characterization of directly compactible layer-by-layer nanocoated cellulose. *Int. J. Pharm.* **2011**, *404* (1-2), 57-65.
268. Smole, M.; Stana-Kleinschek, K.; Ribitsch, V.; Pointner, B.; Zipper, P.; Stakne, K.; Bele, M., Electrokinetic properties of surface modified PETP fibres. *Mater. Res. Innovations* **2002**, *6* (1), 19-23.
269. Sun, Y.; Cui, F.; Shi, K.; Wang, J.; Niu, M.; Ma, R., The effect of chitosan molecular weight on the characteristics of spray-dried methotrexate-loaded chitosan microspheres for nasal administration. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2009**, *35* (3), 379-386.
270. Jameson, E.; Alvarez-Tostado, C.; Sortor, H. H., Electrophoretic Studies on New-Born Calf Serum. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* **1942**, *51* (1), 163-165.
271. Lee, S. W.; Tettey, K. E.; Kim, I. L.; Burdick, J. A.; Lee, D., Controlling the cell-adhesion properties of poly(acrylic acid)/polyacrylamide hydrogen-bonded multilayers. *Macromolecules* **2012**, *45* (15), 6120-6126.

272. Bakkour, Y.; Vermeersch, G.; Morcellet, M.; Boschin, F.; Martel, B.; Azaroual, N., Formation of Cyclodextrin Inclusion Complexes with Doxycyclin-Hyclate: NMR Investigation of Their Characterisation and Stability. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2006**, *54* (1), 109-114.
273. Garza, J. M.; Schaaf, P.; Muller, S.; Ball, V.; Stoltz, J. F.; Voegel, J. C.; Lavalle, P., Multicompartment films made of alternate polyelectrolyte multilayers of exponential and linear growth. *Langmuir* **2004**, *20* (17), 7298-7302.
274. Vodouhê, C.; Guen, E. L.; Garza, J. M.; Francius, G.; Déjugnat, C.; Ogier, J.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Lavalle, P., Control of drug accessibility on functional polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials* **2006**, *27* (22), 4149-4156.
275. Leporatti, S.; Voigt, A.; Mitlöhner, R.; Sukhorukov, G.; Donath, E.; Möhwald, H., Scanning Force Microscopy Investigation of Polyelectrolyte Nano- and Microcapsule Wall Texture. *Langmuir* **2000**, *16* (9), 4059-4063.
276. Müller, C. E., Prodrug Approaches for Enhancing the Bioavailability of Drugs with Low Solubility. *Chem. Biodiversity* **2009**, *6* (11), 2071-2083.
277. Savjani, K. T.; Gajjar, A. K.; Savjani, J. K., Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharmaceutics* **2012**, *2012*, 10.
278. Piccirillo, C.; Perni, S.; Gil-Thomas, J.; Prokopovich, P.; Wilson, M.; Pratten, J.; Parkin, I. P., Antimicrobial activity of methylene blue and toluidine blue O covalently bound to a modified silicone polymer surface. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19* (34), 6167-6171.
279. Nandy, S. K.; Venkatesh, K. V., Application of methylene blue dye reduction test (MBRT) to determine growth and death rates of microorganisms. *African Journal of Microbiology Research* **2010**, *4* (2), 061-070.
280. Petty, W.; Spanier, S.; Shuster, J. J.; Silverthorne, C., The influence of skeletal implants on incidence of infection. Experiments in a canine model. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **1985**, *67* (8), 1236-1244.
281. Mogenet, I.; Raetz-Dillon, S.; Canonge, J. M.; Archambaud, M.; Bonnet, E., *Successful treatment of Staphylococcus epidermidis hip prosthesis infection with oral linezolid*. Whitney: Cincinnati, OH, ETATS-UNIS, 2004; Vol. 38, p 3.
282. Wood, K. C.; Chuang, H. F.; Batten, R. D.; Lynn, D. M.; Hammond, P. T., Controlling interlayer diffusion to achieve sustained, multiagent delivery from layer-by-layer thin films. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (27), 10207-10212.
283. Martins, G. V.; Merino, E. G.; Mano, J. F.; Alves, N. M., Crosslink Effect and Albumin Adsorption onto Chitosan/Alginate Multilayered Systems: An in situ QCM-D Study. *Macromol. Biosci.* **2010**, *10* (12), 1444-1455.

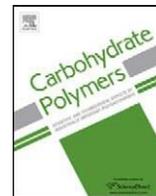
284. Dorta, M. a. J.; Santoveña, A.; Llabrés, M. a.; Fariña, J. B., Potential applications of PLGA film-implants in modulating in vitro drugs release. *Int. J. Pharm.* **2002**, *248* (1–2), 149-156.

Articles



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol

Multilayered textile coating based on a β -cyclodextrin polyelectrolyte for the controlled release of drugs

Adeline Martin^a, Nicolas Tabary^a, Laurent Leclercq^b, Jatupol Junthip^a, Stéphanie Degoutin^a, François Aubert-Viard^d, Frédéric Cazaux^a, Joël Lyskawa^a, Ludovic Janus^a, Marc Briac^c, Bernard Martel^{a,*}

^a Université Lille 1, Unité Matériaux et Transformations (UMET) UMR CNRS 8207, Villeneuve d'Ascq, France

^b Université Montpellier 1, Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) UMR CNRS 5247, Montpellier, France

^c Université Lille 1, Centre Commun de Mesures RMN, Villeneuve d'Ascq, France

^d INSERM U 1008, Controlled Drug Delivery Systems and Biomaterials, Lille, France

Article info

Article history:

Received 8 September 2012

Received in revised form 14

December 2012

Accepted 19 December 2012

Available online 27 December 2012

Keywords:

Non-woven textile
Layer-by-layer Drug
release system
Chitosan
Cyclodextrin polymer
OWLS

Abstract

The aim of this work was to develop the formation of multilayered coating incorporating a cyclodextrin polyelectrolyte onto a non-woven polyethylene terephthalate (PET) textile support in order to obtain reservoir and sustained release properties towards bioactive molecules. We optimized the multilayer assembly immobilization onto the PET surface according to the layer-by-layer (LbL) deposition process. After a pre-treatment of the textile support aiming to offer a sufficient ionic character to the surface, it was alternatively immersed into two polyelectrolytes aqueous solutions consisting of chitosan (CHT) as polycation on the one hand, and a β -cyclodextrin polymer (polyCTR- β CD) as polyanion on the other hand. In a second approach, a TBBA/polyCTR- β CD complex (4-tert-butylbenzoic acid, TBBA) was used in order to load the system with a drug model whose kinetics of release was assessed. Gravimetry, microscopy, OWLS, colorimetric titration, infrared and zetametry were used as characterization techniques. An effective deposition on the textile surface due to ionic interactions with alternation of up to 10 layers of each of both polyelectrolytes was clearly evidenced. However, we observed that layer formation occurred to a lesser extent when TBBA/polyCTR- β CD complex was applied instead of polyCTR- β CD alone. The release study showed that drug reservoir properties and release kinetics could be controlled by the number of layers in the system and that TBBA release was faster than the multilayered coating degradation.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

3. Introduction

Biomaterials are currently used in a wide range of surgical specialties. Their function consists of replacing, reinforcing or repairing failing organs. Despite the chemical stability and biocompatibility of raw materials used in their manufacture, such implants frequently cause side effects such as inflammation, thrombosis, or infections and involve some short or long term post operative complications that may prolong the healing period or provoke mortality in the worst cases (Franz, Rammelt, Scharnweber, & Simon, 2011). In the last two decades some efforts have been made by researchers to find solutions in order to improve the tissue integration of medical implants in the body (Elvin et al., 2010; Teo et al., 2011). Among the most efficient solutions, surface treatment of biomaterials has been investigated aiming to modify their physicochemical properties to

control cell proliferation or adhesion (Gendron et al., 2012; Lawrence et al., 2012), or to reduce bacterial colonization (Nitescu, Dumitriu, Dumitru, Traistaru, & Burlibas, 2012). Another strategy consisted of transforming the device into a drug delivery system capable of releasing some drugs or bioactive substances (Degoutin et al., 2012; García-González, Alnaief, et Smirnova, 2011). In this case, the main challenges are firstly to chemically modify such inert materials with soft methods in order to keep their original properties (biocompatibility, mechanical resistance), and secondly to adsorb a sufficient therapeutic dose of the drug that should then be released covering the critical healing period.

Cyclodextrins (CDs) and their polymers have proved to be appropriate candidates for this purpose (Uekama, Hirayama, & Irie, 1998). Due to the hydrophobic character of their cavities, they are known to form reversible inclusion complexes with many hydrophobic bioactive molecules and promote their solubility (Connors, 1997; Loftsson & Brewster, 1996). Therefore, CDs are widely used for their encapsulation properties as drug carriers (Li, Xiao, Li, & Zhong, 2004; Rajewski & Stella, 1996; Sun et al., 2012; Uekama et al., 1998).

* Corresponding author at: Université Lille 1, Unité Matériaux et Transformations, Bâtiment C6, Bureau 119, 59655 Villeneuve d'Ascq, France. Tel.: +33 3 20 43 46 35; fax: +33 320 43 65 91.
E-mail address: bernard.martel@univ-lille1.fr (B. Martel).
0144-8617/\$ – see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.12.055>

Owing to an original pathway to fix cyclodextrins onto porous and fibrous materials, our group has published many papers concerning biomaterials with improved reservoir and sustained delivery of antibiotics. For example, treated materials include hydroxyapatite porous ceramics as bone substitutes (Leprêtre et al., 2009; Tang, Zhao, Sha, & Liu, 2012), PVDF membranes applicable to guided tissue regeneration in periodontology (Boschin et al., 2006; Leprêtre et al., 2007; Tabary et al., 2007) and to a greater extent, vascular (Blanchemain et al., 2005, 2007a, 2007b, 2011) and parietal textile implants (El Ghoul et al., 2008; Laurent et al., 2011).

The present work aims to describe an evolution of the latter fix- ing concept by applying the layer-by-layer (LbL) approach. Over the past several years, Decher and others developed the layer-by-layer process (Decher, Hong, & Schmitt, 1992; Decher & Schmitt, 1992; Decher, 1997; Dubas & Schlenoff, 2001) as a tool for surface modification on various materials like quartz substrate (Decher et al., 1992; Decher & Schmitt, 1992), glass (Lvov, Decher, & Moehwald, 1993), cotton woven fabric (Karimpil, Melo, & D'Souza, 2012; Wang & Hauser, 2009) or cellulose (Deng et al., 2010). Among the possible techniques of polyelectrolytes multilayer build-up (Seantier & Deratani, 2012), dip-coating consists of dipping samples alternatively in anionic and cationic polyelectrolyte solutions, allowing adsorption by electrostatic interactions and then formation of multilayer assemblies over the substrate. This technique is fast, easy to use, with a soft and biocompatible process (mainly in water) and seems to be adjustable to any kind of substrates.

The application of the LbL technique for biological or biomedical purposes requires the use of bioactive polyelectrolytes in the build up, or by loading a low molecular bioactive compound in the multilayer assembly (Burke & Barrett, 2003; Caruso, Niikura, Furlong, & Okahata, 1997; Lvov, Ariga, Ichinose, & Kunitake, 1995). For instance, literature abundantly reports the use of chitosan as positive polyelectrolyte incorporated in the LbL coating, which offers its intrinsic antimicrobial properties to treated surfaces (Fu, Ji, Yuan, & Shen, 2005) throughout extended degradation of the assembly.

Using LbL assembly for its reservoir properties towards drugs was previously reported (Benkirane-Jessel et al., 2004; Gribova, Auzely-Velty, & Picart, 2011). This path requires complexation or hosting properties of the cationic and/or anionic polyelectrolytes towards the targeted active molecule. In this case the use of cyclodextrin, well known for its host-guest complexation properties, is one of the most relevant solution. For example, encapsulated piroxicam in cyclodextrins was used to build a multilayer assembly with anti-inflammatory properties (Benkirane-Jessel et al., 2004). Biological activity was still present after 12 h, even if the maximum activity was found after few hours.

Our strategy was based on both of the above mentioned approaches, wherein chitosan was used as the cationic polyelectrolyte. This natural and biocompatible polymer is often used in biomaterials (Costa-Júnior, Barbosa-Stancioli, Mansur, Vasconcelos, & Mansur, 2009; Rinaudo, 2006; Venkatesan, Ryu, Sudha, & Kim, 2012) due to its well-known intrinsic antibacterial and hemocompatible properties (Bhardwaj & Kundu, 2011) and its ability to be incorporated in multilayer assemblies on solid surfaces (Lin, Ren, & Ji, 2009; Fu et al., 2005). Its role is to ensure insertion of the anionic cyclodextrin polymer in the multilayer system, and also to ensure its relative stability, as a result of its slow biodegradation. The polyanionic specie polyCTR- β CD is a watersoluble cyclodextrin polymer issued from the crosslinking reaction between citric acid (CTR) and β CD (Martel, Morcellet, Ruffin, Ducoroy, & Weltrowski, 2002; Martel, Morcellet, & Weltrowski, 2002; Martel, Weltrowski, Ruffin, & Morcellet, 2002; Martel, Ruffin, Weltrowski, Lekchiri, & Morcellet, 2005) known for its ability to complex drugs (Bakkour et al., 2006; Joudieh, Bon, Martel, Skiba, & Lahiani-Skiba, 2009). So far, multilayer systems including

cyclodextrins based polyelectrolytes for drug delivery purposes have never been reported. Dubacheva studied neutral polymers, where layers interfered by host-guest complexation between hydrophilic polymers bearing cyclodextrins as pendent groups on the one hand, and ferrocene groups on the other hand (Dubacheva et al., 2010). Semenov et al., reported the gelation of associating polymer systems, where polymeric hyaluronan-based or chitosan-based backbones were modified with cyclodextrin and adamantane as associating groups (Semenov, Charlot, Auzély-Velty, & Rinaudo, 2007). Though, in such systems the cyclodextrin's role was to ensure the association with the other polymeric species, but not to deliver any drug.

Because of its low cost, chemical stability, mechanical properties and biocompatibility, PET is a widespread biomaterial (Chen & McCarthy, 1997; Köstler, Ribitsch, Stana-Kleinschek, Jakopic, & Strnad, 2005) especially used for vascular implants, inguinal meshes or sutures (Franklin et al., 2009). For these reasons a non-woven PET substrate was chosen in the present study. In order to ensure the adhesion of the multilayer coating onto the textile, a pretreatment is required to impart charge density onto the fibre surface. Therefore, we applied a previously described method that transformed raw PET into an ion exchange textile through a pad-dry-cure process, the resulting support bears carboxylate functions that would interact with the protonated amino groups of the first chitosan layer of the LbL system (Ducoroy, Bacquet, Martel, & Morcellet, 2007; Ducoroy, Martel, Bacquet, & Morcellet, 2007; Ducoroy, Bacquet, Martel, & Morcellet, 2008).

In this study we report the pretreatment of a PET textile support through the pad-dry-cure process, after which we describe the building of a self-assembled LbL coating monitored by optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS) (Abdelkebir et al., 2011; Lavallo et al., 2002; Ngankam, Mao, & Van Tassel, 2004; Ngankam & Van Tassel, 2005; Wittmer, Phelps, Saltzman, & Van Tassel, 2007). Then the LbL deposition was applied to the textile support by the dip-coating method, and followed by the weight gain of the samples versus the number of deposited layers. A characterization by zeta potential was assessed in the course of

the successive depositions of polyCTR- β CD and chitosan layers.

Acid orange titration allowed us to quantify chitosan deposition on supports versus the number of layers in the system. Once the drug model free system was characterized, LbL process was applied using the 4-tert-butylbenzoic acid (TBBA)/polyCTR- β CD complex. TBBA was selected for its known capability to form a stable inclusion complex with β CD (Auzély-Velty & Rinaudo, 2001; Weickenmeier, Wenz, & Huff, 1997; Wenz et al., 2008) and for its easy detection and titration by UV spectrophotometry in the bulk batch release medium. The targeted application of our new system will consist of the release of antimicrobial agents and in a second antiproliferative drugs in cancer therapies (Jang, Akgun, Kim, Satija, & Char, 2012).

4. Experimental

2.1. Materials

Non-woven polyethylene terephthalate (PET, weight = 65 g/m², thickness = 0.24 mm, reference NSN 365) was provided by PGI-Nordlys (Bailleul, France).

All commercial products were used as received. The native β CD used in this work was provided by Roquette (Lestrem, France). Citric acid (CTR), sodium hypophosphite monohydrate (NaH₂PO₂·H₂O), sodium carbonate (Na₂CO₃), sodium hydroxide (NaOH), calcium acetate and 4-tert-butyl benzoic acid (TBBA) were commercial chemical grade products, supplied from Aldrich Chemicals

(St. Quentin Fallavier, France). Glacial acetic acid (99–100%) was a J.T. Baker product.

Chitosan low molecular weight grade (59,200 < M_v < 65,000 g mol⁻¹, determined by viscosimetry) was purchased from Aldrich Chemicals. The 85% deacetylation degree of chitosan was determined by UV spectrophotometry using N-acetylglucosamine as reference in hydrochloric acid (Pedroni, Gschaider, & Schulz, 2003). This corresponded to 5 mmol of cationic ammonium functions per gram of chitosan.

2.2. Methods

2.2.1. Pre-treatment of the textile support by pad-dry-cure

Textile samples were systematically thoroughly washed in soxhlet extractor with isopropanol, then with water (2 h and 3.5 h respectively) and dried during 30 min at 90 °C.

In order to allow ionic interactions between support and the first chitosan layer of the LbL assembly, we applied a pad-dry-cure textile finishing process previously reported (Ducoroy, Bacquet et al., 2007; Ducoroy, Martel et al., 2007; Martel, Morcellet, Ruffin et al., 2002; Martel, Morcellet, & Weltrowski, 2002; Martel, Weltrowski et al., 2002). The non-woven PET fabrics (10 cm × 5 cm) were impregnated by an aqueous solution containing βCDs, catalyst and CTR, whose composition is reported as 10/3/10 related to the weight in gram unit of βCDs, catalyst and CTR, respectively, dissolved in 100 mL of water. The textile was then roll-squeezed (Roaches, England) and dried at 90 °C for 5 min. Curing occurred in a thermo-fixation oven (Minithermo®, Roaches, UK) at 150 °C for 30 min. Finally, samples were thoroughly washed in soxhlet extractor (500 mL) with water during 3.5 h in order to remove unreacted products. The weight gain (WG) (%) representing the yield of the thermofixation reaction was calculated using the equation:

$$WG (\%) = (M_f - M_i) / M_i * 100$$

where M_i and M_f correspond respectively to the sample weight before and after treatment, measured with a precision balance (± 4.10 –4 g). Before weighing, all samples were dried at 90 °C for 30 min. Experiments were performed in triplicate and averaged.

The above mentioned process resulted in the functionalization of the PET textile by a highly cross-linked polymer formed between βCD and CTR. This occurred via a polyesterification reaction between the latter reactants, forming a coating physically anchored onto the PET fibres (Fig. 1b) (Martel, Morcellet, Ruffin et al., 2002; Martel, Morcellet, & Weltrowski, 2002; Martel, Weltrowski et al., 2002).

The ion exchange capacity (IEC) of the thermofixed samples was determined using the calcium acetate method described in the United States Pharmacopoeia (USP 1995). 500 mg of textile sample were placed in 50 mL of a calcium acetate solution (2 wt%) for 1 h under magnetic stirring. The solution was filtrated and then titrated by a standard 0.05 N NaOH solution using phenolphthalein as indicator. The amount of carboxylic functions was calculated by the following equation:

$$IEC (\text{mmol/g}) = \frac{C_b \times V_e (\text{mL})}{\text{sample weight (mg)}}$$

where C_b and V_e correspond respectively to the concentration of the NaOH solution and the equivalent volume.

In this work, the thermofixed layer applied in the pre-treatment step was conventionally counted as layer 1.

2.2.2. Water-soluble polyCTR-βCD synthesis

Water soluble polyCTR-βCD (structure in Fig. 1a) that was used as anionic polyelectrolyte in the LbL system was synthesized

according to a method previously reported (Martel, Morcellet, Ruffin et al., 2002; Martel, Morcellet, & Weltrowski, 2002; Martel, Weltrowski et al., 2002; Martel et al., 2005).

Acid–base titration displayed the presence of 5 mmol of COOH functions per gram of polyCTR-βCD (Martel et al., 2005). M_w measured by size exclusion chromatography (SEC) in water equipped with a light scattering detector was 75,000 g mol⁻¹.

The structure corresponds to a crosslinked polymer network where each βCD moiety was linked to neighbouring βCDs by the intermediate of citrate crosslinks (see Fig. 1). The solubility in water of polyCTR-βCD was 1000 g/L, compared to the solubility of the native βCD (18.5 g/L).

2.2.3. Layer by layer (LbL) construction

The multilayer assembly was built using the LbL method as reported by Decher et al. (1992) and Decher and Schmitt (1992). Samples (3 cm × 3 cm) were cut off from the previously cyclodextrin thermofixed textile as described above (cf. Section 2.2.1). In order to transform all surfacic carboxylic groups into carboxylate groups, all samples were dipped into a sodium carbonate Na₂CO₃ solution (0.1 M) for 10 min then rinsed three times with distilled water and dried for 30 min at 90 °C.

Successive adsorption and rinsing steps of the dip-coating technique were carried out at room temperature under stirring (150 rpm) as schematized in Fig. 2. Firstly, the thermofixed samples were dipped into 50 mL of a chitosan solution (5 g/L) solubilized in acetic acid 10 mL/L for 15 min (solution 1), dried at 90 °C for 15 min, rinsed with a 3 mL/L acetic acid solution for 15 min to remove excess of chitosan (solution 2) and finally dried at 90 °C for 15 min. Then the sample was dipped into a polyCTR-βCD aqueous solution (4 g/L) for 15 min (solution 3), dried at 90 °C for 15 min, rinsed with distilled water for 15 min (solution 4) and dried at 90 °C for 15 min. The next layers were deposited by applying this sequence n times. The first chitosan layer adsorbed onto the thermofixed layer was labelled as layer 2, while the following polyCTR-βCD layer was labelled layer 3, so self-assembled chitosan and polyCTR-βCD layers presented even and odd labels, respectively.

Same process was used to build multilayer assembly incorporating a model molecule. In this case, the anionic layer was formed by dipping the sample into an aqueous solution of polyCTR-βCD/TBBA complex. TBBA complexes with β-cyclodextrin have already been studied (Auzély-Velty & Rinaudo, 2001; Wenz et al., 2008) and show a stable 1:1 complex in solution whose formation constant value was 18,400 mol⁻¹ (Weisser, Nelles, Wenz, & Mittler-Neher, 1997). We confirmed this result by isothermal titration calorimetry (ITC), measuring a 17,000 ± 1000 mol⁻¹ constant (with $n = 0.98$).

Because of the low solubility of TBBA in water (50 mg/L at 20 °C, $pH = 4.3$), the complex formed in multilayer assemblies is not stoichiometric. A saturated aqueous solution of TBBA was first prepared (50 mg/L). An excess of polyCTR-βCD (4 g/L) was then dissolved in the TBBA solution and left under stirring during 24 h. The molar ratio of TBBA to βCD units in polyCTR-βCD was 1:6. To obtain the TBBA complex incorporation in the multilayer system, the textile samples were dipped for 30 min in this solution, followed by a drying step at 90 °C for 15 min, rinsing with distilled water for 15 min and drying at 90 °C for 15 min.

The weight gain after each step was determined following this equation:

$$WG (\%) = (M_n - M_i) / M_i * 100$$

where M_i and M_n are respectively the weight of the starting raw PET and after the thermofixation step or after the deposition of the adsorbed layers by dip coating.

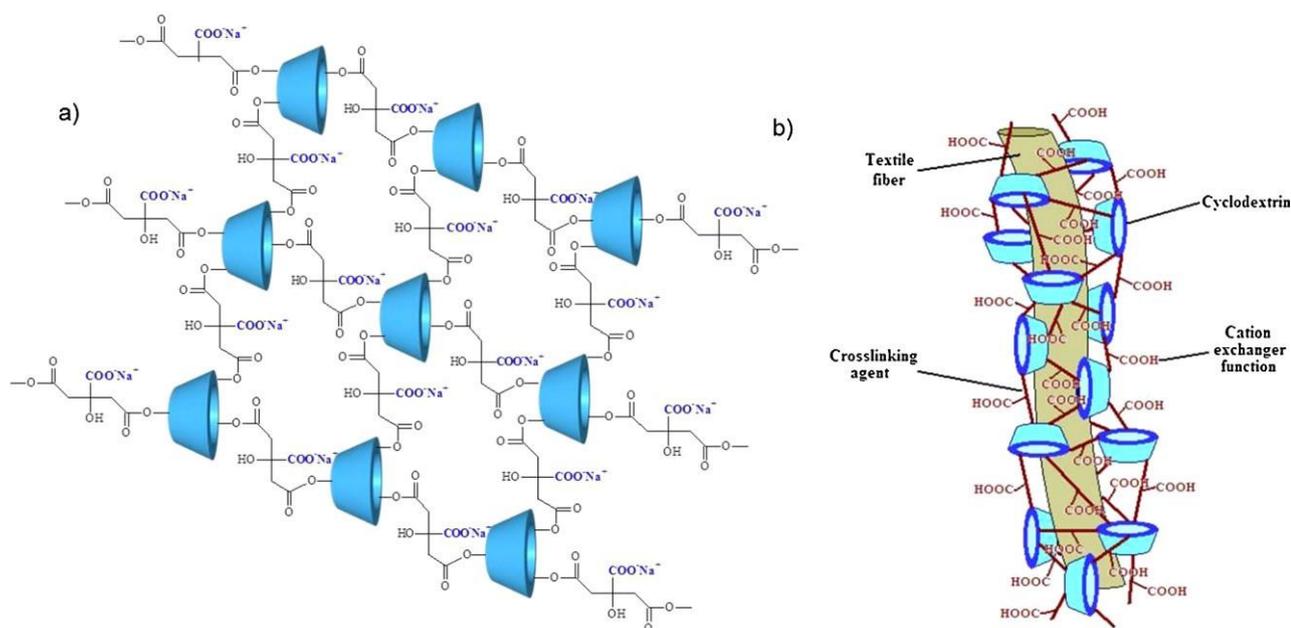


Fig. 1. (a) Schematic representation of the structure of the water-soluble polyCTR-βCD in its basic form, when synthesized in a reactor to yield polyCTR-βCD and (b) the same polymer, coating the PET fibres during the pad-dry-cure process (Ducoroy, Martel et al., 2007).

2.2.4. Microscopy

Samples were observed with an Olympus BX41 optical microscope. Scanning electron microscopy (SEM) investigations were carried out on a Hitachi S-4700 SEM FEG (Field Emission Gun) operating with an acceleration voltage of 5 KV. As the samples were non-conducting, they were covered with a conducting carbon layer to prevent charging.

2.2.5. TGA

Thermogravimetric analysis experiments were performed with a TGA Q50 apparatus (TA Instruments) from ambient to 500 °C with a heating rate of 5°C/min. The sample was placed in an open platinum high temperature pan and the oven was flushed with highly pure nitrogen gas (90 mL/min).

2.2.6. FTIR

A PerkinElmer spectrometer (spectrum 1) equipped with Spectrum software was used to perform the FTIR analyses. The attenuated total reflectance (ATR) FTIR spectra (3 bounces) were collected from 16 scans in the 400–4000 cm⁻¹ range with a resolution of 4 cm⁻¹. Spectra of chitosan and polyCTR-βCD powders were performed from KBr pellets (1% w/w in KBr).

2.2.7. Study of layer by layer adsorption by OWLS

Optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS) is emerging as a powerful tool to investigate interactions of molecules and macromolecules on surfaces quantitatively (Gray, 2004; Scott et al., 2008; Tie, Calonder, & Van Tassel, 2003), including adsorption, binding and adhesion processes (Brusatori & Van Tassel, 2003; Eggleston et al., 2008; Kurrat, Textor, Ramsden, Boni, & Spencer, 1997; Kurrat, Prenosil, & Ramsden, 1997). The fundamentals of OWLS have been described in details (Tiefenthaler & Lukosz, 1989). In summary, a linearly polarized light (He–Ne laser) is coupled with the evanescent light by a diffraction grating into a waveguide layer, provided that the in-coupling condition is fulfilled. The in-coupling is a resonance phenomenon that occurs at two well-defined angles of incidence (electric and magnetic modes) depending on refractive index of the medium closely covering the surface of the waveguide. The light is guided by total internal reflection to the edges of the waveguide where it is detected by a photodiode. The sensor chip is based on a fine optical grating prepared on a thin waveguide layer carried by a glass substrate. Refractive index and thickness of the adsorbed molecules and hence adsorbed mass per unit area can be evaluated (Picart et al., 2001; Vörös et al., 2002). Like SPR, OWLS is label-free and its sensitivity is c.a. 1 ng/cm².

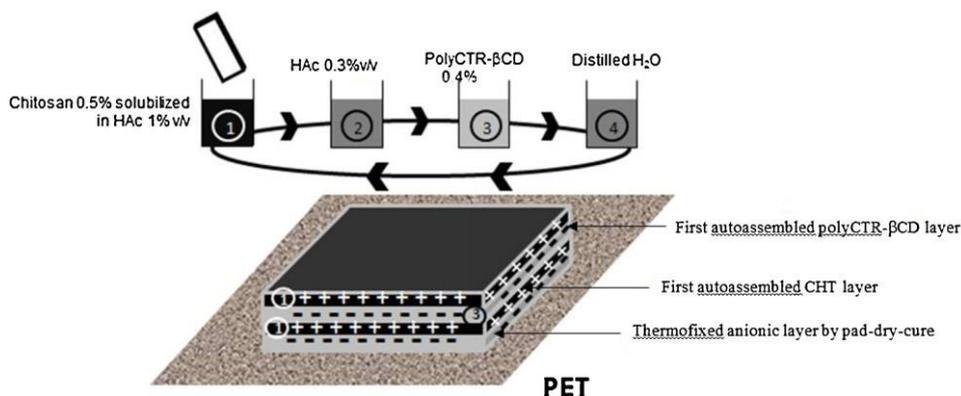


Fig. 2. Schematization of the layer-by-layer construction of the multilayer assembly by the dip-coating method applied on the pre-treated non-woven PET by pad-dry-cure. The thermofixed layer applied in the pre-treatment step was conventionally counted as layer 1.

Coating amount and thickness were assessed using a Microvacuum Ltd. (Budapest, Hungary) OWLS 120 apparatus composed of a SIS06 standard sub-unit for sample injection, a controlled NE-1000 syringe pump and a 100 μ L loop. The light source was a linearly polarized He–Ne laser emitting at 632.8 nm. The sample holder was kept at controlled temperature by a Peltier temperature control device governed by an Omron controller built into the TC unit. All the measurements and calculations were performed using the Biosense 2.6 software.

The sensor chip of the optical waveguide was based on a fine optical grating engraved on a thin waveguide layer carried by a glass substrate. The grating was 12 mm long and 2 mm wide, with a periodicity of 2400 lines/mm. Waveguide material was SixTi(1–x)O₂, where $x = 0.25 \pm 0.05$ with a thickness (dF) of 165 nm. As the chip surface is negatively charged, the first polyelectrolyte to be injected is a polycation.

Prior to each experiment, the chip surface was cleaned by contact with a 4N HCl/H₂SO₄ aqueous solution and sonicated for 15 min prior to rinsing with water and acetone successively. The polyelectrolytes were injected at a concentration of 5 g/L for chitosan (in 10 mL/L acetic acid) and 6 g/L for the polyCTR- β CD (in 0.1 M phosphate buffer). Experiments were conducted under continuous 50 mm³/min flow until a plateau was reached or at least well engaged when levelling off required too much time. Rinsing with 0.1 M phosphate buffer (pH = 4.8) was performed between each layer deposition to remove weakly adsorbed molecules that did not resist washing conditions. A maximum of 13 layers was applied. In OWLS experiments, intermediate rinsing conditions did not exactly correspond to those applied on textile and described in Section 2.2.3, because OWLS procedure needs the same buffer for baseline and washing solutions to suppress differences in refractive index. Experiments were realized in triplicate and the standard deviation was about 10%.

2.1.1. Zetametry

Zeta Potential was determined with a Zetacad apparatus at Ecole Nationale Supérieure des Arts et Industries Textiles (ENSAIT), Roubaix, France.

All samples were immersed during 24 h into a KCl aqueous solution (10–3 M) and the pH was adjusted to the desired value using aqueous solutions of HCl and KOH (0.1 M). Measurements were realized in triplicate and averaged.

2.1.2. Colorimetric titration with acid orange (AO)

Colorimetric titration with AO was used to determine quantity of amines issued from chitosan present on the surface (Hamerli, Weigel, Groth, & Paul, 2003; Uchida, Uyama, & Ikada, 1193).

A 2.5×10^{-2} mol/L acid orange solution was prepared in distilled water and pH was adjusted to 3 using HCl 0.5 M. Each sample was dipped in 10 mL of this solution under stirring (60 rpm) overnight at 25 °C in order to adsorb AO. Samples were then washed twice for 5 min under stirring in 20 mL of acidic water (pH = 3, adjusted with 0.5 M HCl). Desorption occurred by immersing the samples into 10 mL of a solution at pH = 12 (adjusted with 0.5 M NaOH) for 24 h at 25 °C under stirring. Finally pH of each solution was adjusted to 3 with 1 mL of HCl 0.1 M and absorbance was measured at 485 nm.

A calibration curve was preliminarily made using the experimental procedure mentioned above on textile samples impregnated with a precise volume of a 10 g/L chitosan solution dissolved in acetic acid solution (10 mL/L) of and dried.

2.1.3. Degradation of the multilayer assembly

Samples modified by the LbL process were placed in individual flasks in 50 mL of distilled water under stirring (100 rpm) on an orbital shaker thermostated at 37 °C (Thermoshake, Gerhardt, Les Essarts-le-Roi, France), periodically removed from the system, dried (30 min, 90 °C) and weighed; then put back in the flasks filled

with 50 mL of fresh water. Reported data are the average values of 6 replicates. To evaluate the weight loss and to simultaneously compare assembly and degradation of the multilayers, the weight loss (WL in %) was calculated from the mass of the virgin PET as reference, following the equation:

$$WL (\%) = (M_f - M_i) / M_i * 100$$

where M_i is the mass of the virgin PET without any treatment and M_f is the mass of the treated support after the degradation at different times.

2.1.4. TBBA release study

Textile samples (3 cm \times 3 cm) were dipped in flasks containing 20 mL of distilled water under stirring (120 rpm) at 37 °C. To assess at the same time both the weight loss of the samples due to LbL system degradation and TBBA release in solution, samples were periodically removed from the batch, dried and weighed. At the same time, aliquots (2 mL) of the soaking solution were transferred into quartz cells (1 cm). The TBBA released in the bulk solution was determined by UV–vis spectrophotometry (Shimadzu UV – 1800 Spectrometer) at 240 nm after calibration (molar extinction coefficient of TBBA in water was 0.0702 L mg⁻¹). Withdrawn aliquots were then returned into the batch solutions in order to keep the volume of the supernatant unchanged.

2.1.5. Complexation study by NMR

All experiments were recorded using a spectrometer Brüker AvanceTM 400 equipped with a Brüker Ultra-Shield 9.4 T (proton Larmor frequency of 400.33 MHz). We used a BBI probe (1H, X). Two-dimensional NOESY experiments were acquired in the phase-sensitive mode using the Brüker ASX 400 (9.4 T) spectrometer. The probe temperature was regulated to 300 K. Each spectrum consisted of a matrix of 2 K (F2) by 2 K (F1) covering a sweep width of 4084 Hz. We used spin-lock mixing periods of 500 ms. Before Fourier transformation, the sine apodization functions were applied in both dimensions. 256 increments were collected with 80 transients in each.

5. Results and discussion

3.2. Pre-treatment of PET by thermofixation

Our strategy to promote the fixation of the LbL assembly onto the fibrous support consisted of the raw PET surface functionalization with a coating polymer rich in carboxylate groups that would promote the adsorption of the first chitosan layer. Therefore, we applied the process that was previously reported (Ducoroy, Bacquet et al., 2007; Ducoroy, Martel et al., 2007) and yielded ion exchange properties to the textile. In the present case, Fig. 3 shows the parallel evolution of the weight gain and IEC of the support with time and curing temperature. The weight gain is attributed to the coating of the fibres by the in situ crosslinking reaction between cyclodextrin and citric acid (Martel, Morcellet, Ruffin et al., 2002; Martel, Morcellet, & Weltrowski, 2002; Martel, Weltrowski et al., 2002). Besides, IEC was reported as the amount in mmol of carboxylate groups per gram of support available on this thermofixed coating. As a matter of fact, increasing the density of negative electrostatic charges on the support surface should promote the interactions with the first cationic layer (chitosan), and with the whole multilayered coating.

As shown in Fig. 3, both weight gain and IEC presented a high limit value after 30 min of curing at 150 °C: 20 wt% and 0.7 mmol/g of textile, respectively. Besides, as curing time was set to 30 min and temperature was increased, IEC levelled off above 150 °C while the weight gain of the sample still increased.

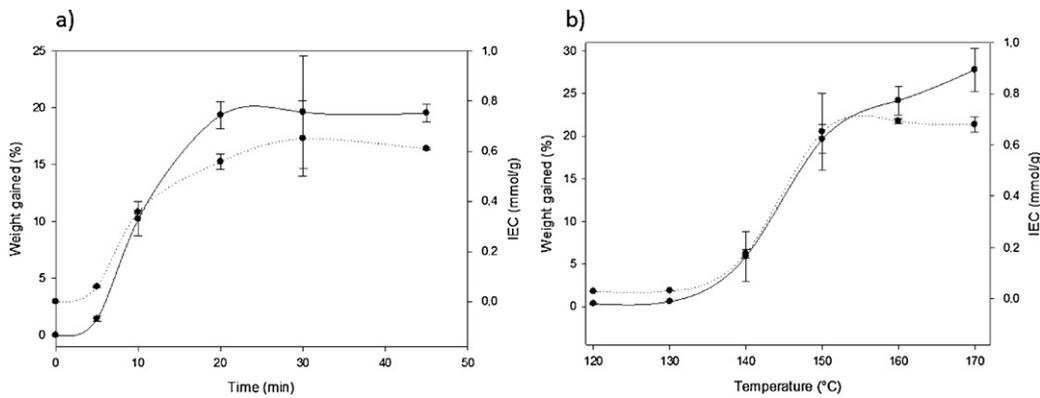


Fig. 3. Influence of the curing parameters on the weight gain (—) and ion exchange capacity (IEC) (···) of the pre-treated non-woven PET; (a) with time, temperature fixed at 150 °C; (b) with temperature, curing time fixed at 30 min.

This feature was noticed in a previous study where we even reported a decrease rather than a stagnation of the IEC, that we attributed to a high conversion rate of the carboxylic groups of CTR residues into ester groups through the reaction with the polysaccharidic hydroxyls (Ducoroy, Bacquet et al., 2007; Ducoroy, Martel et al., 2007). So, setting the curing parameters at 150 °C for 30 min yielded the highest carboxylate functions available for immobilizing the superior layers.

3.3. Building of the multilayer assembly

3.3.1. Monitoring approach by OWLS

The build-up of the multilayer assembly was followed in situ by OWLS. Chitosan and polyCTR- β CD were alternatively deposited on a SiO₂/TiO₂ anionic waveguide surface. This was repeated in order

to cumulate n layers on the surface, even and odd n values corresponding to chitosan, and polyCTR- β CD layer respectively.

For better comprehension of OWLS spectrum, evolution of mass and thickness on an assembly of 3 layers was shown in Fig. 4a. Sharp peaks corresponded to the injections of polyelectrolytes. As soon as a plateau was obtained, rinsing step was carried out to remove non-adsorbed components, leading to a decrease of the mass deposited and to a new plateau. As seen, there are no big differences between mass deposited of anionic or cationic layers.

Fig. 4b shows the OWLS signal with time on an assembly of 13 layers. Fig. 4c was plotted from the plateau values measured after each rinsing step, in function of the number of layers. The evolution of the thickness of the 13-layers system was also reported in nm, calculated from the layer data. After the three first layers, a regular

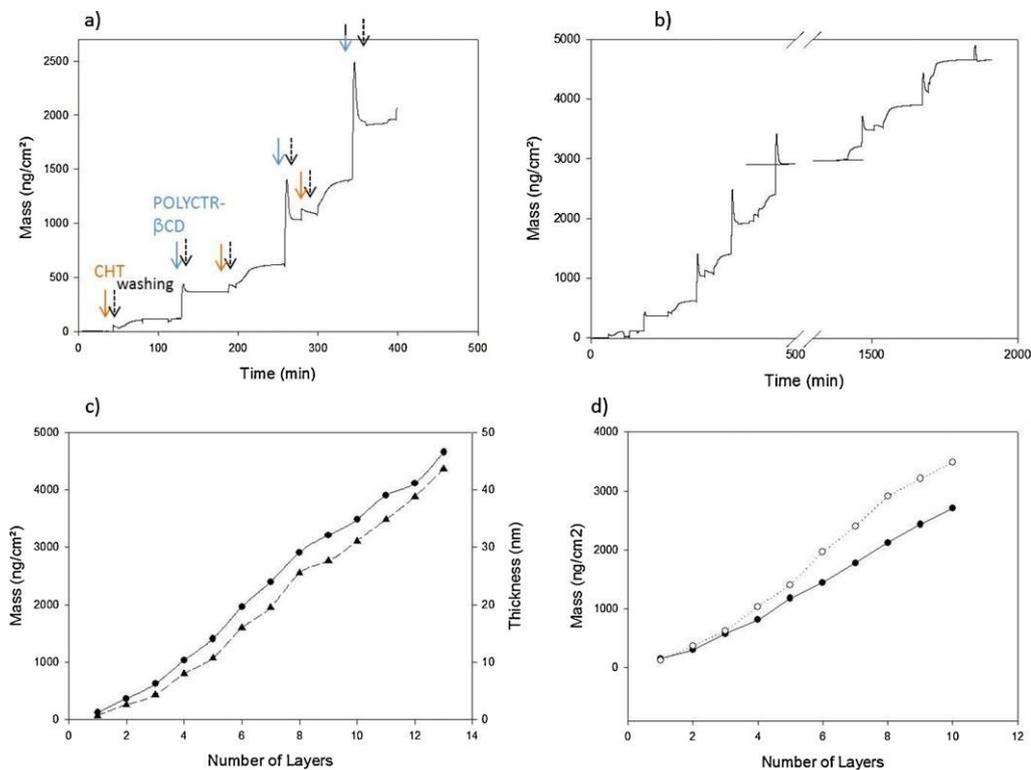


Fig. 4. (a) Evolution of the first 3 self-assembled layer film mass in ng/cm² followed by OWLS; ([chitosan] = 5 g/L in 10 mL/L HAc, [polyCTR- β CD] = 6 g/L in phosphate buffer solution pH = 4.8, washing between injections with phosphate buffer solution pH = 4.8); (b) evolution of the film mass of 13 layers in ng/cm² followed by OWLS; ([chitosan] = 5 g/L in 10 mL/L HAc, [polyCTR- β CD] = 5.2 g/L in phosphate buffer solution pH = 4.8, washing between injections with phosphate buffer solution pH = 4.8); (c) evolution of the cumulative mass (●) and thickness (▲) deposited on the surface against the number of deposited layers (13 layers); (d) evolution of cumulative mass deposited on the surface against the number of layers with (●) and without (○) encapsulated TBBA in the assembly.

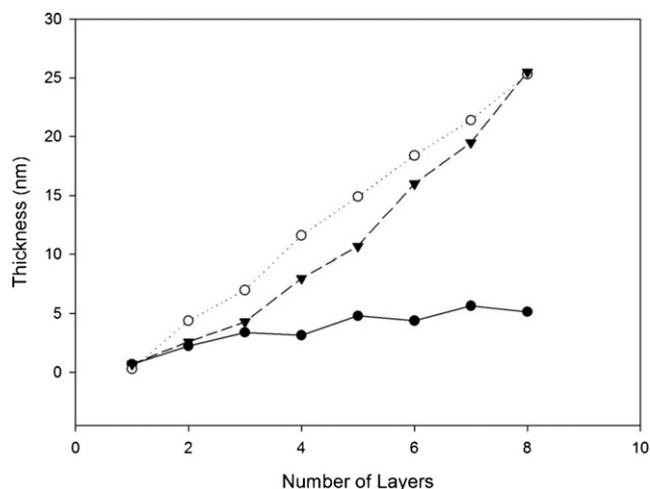


Fig. 5. Evolution of the film thickness obtained by LbL deposition of polyelectrolytes on the OWLS chip at different ionic strengths: NaCl 0 M (\blacktriangledown), NaCl 0.1 M (O), NaCl 1 M (\bullet) ([chitosan] = 5 g/L in 10 mL/L HAc, [polyCTR- β CD] = 5.2 g/L in phosphate buffer solution pH = 4.8, washing between injections with phosphate buffer solution pH = 4.8).

evolution of the multilayer system was observed, with an average thickness of 2.85 nm/layer.

Fig. 5 reports ionic force influence on the build-up of the polyelectrolyte multilayer. As observed, a high ionic force (1 M) prevented building of the multilayer. The thickness obtained in 1 M NaCl was low (compared to that under lower saline conditions). Under high ionic strength conditions, it was found that the roughness on the surface increased (Lvov et al., 1993), which caused perturbations in the multilayer assembly. Moreover, it is well known that polyelectrolytes adsorb in a “flat” conformation in the absence of salt, whereas at higher ionic strength they adsorb in a “loop” conformation (Decher et al., 1992; Decher & Schmitt, 1992), and screen effects are stronger than electrostatic interactions. A very high ionic strength caused a desorption of previous layers due to a swelling effect (Dubas & Schlenoff, 2001). Fig. 5 shows that at low ionic strength or in the absence of salt, the building was optimal with thickness reaching 25 nm after the deposition of 6 layers.

OWLS indicated also that at low pH (pH < 2) it was not possible to adsorb polyCTR- β CD onto the first chitosan layer, so the

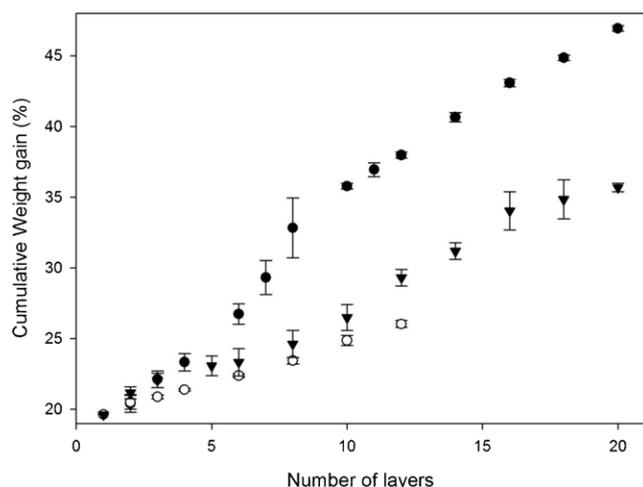


Fig. 6. Evolution of cumulative weight gain with the number of layers on PET support for the multilayer assembly at different concentrations: (\bullet) chitosan = 5 g/L in 10 mL/L HAc and polyCTR- β CD = 4 g/L in H₂O, (\circ) chitosan = 2.5 g/L in 10 mL/L HAc and polyCTR- β CD = 2 g/L w/v in H₂O, and (\blacktriangledown) chitosan = 5 g/L in 10 mL/L HAc and polyCTR- β CD = 4 g/L in a 50 mg/L aqueous solution of TBBA.

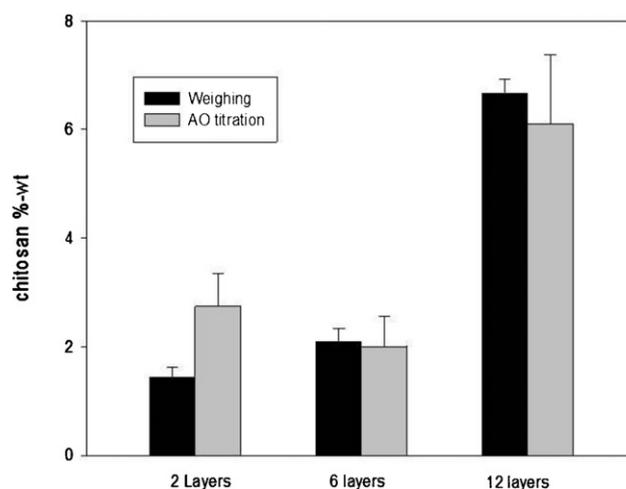


Fig. 7. Chitosan quantities determined by weight gain (black bars) and by acid orange titration (grey bars) with different numbers of layers at the surface.

carboxylate form of polyCTR- β CD should be required rather than the carboxylic form, which confirms the electrostatic interactions involved in the LbL process.

3.3.2. LbL build-up onto pre-treated textile samples

The textile supports pre-treated by thermofixation were preliminarily dipped in a sodium carbonate (0.1 M Na₂CO₃) solution in order to provide carboxylate groups onto their surface. Then, they underwent the LbL treatment with chitosan (C = 5 g/L) and polyCTR- β CD, (C = 4 g/L) in absence of any additional salt. The same experiment was applied in the presence of twice diluted solutions (chitosan (C = 2.5 g/L) and polyCTR- β CD (C = 2 g/L)). Fig. 6 shows the evolution of the weight gain of the samples treated in both conditions. One can observe that the initial weight gain after thermofixation was WG = 19.6%. For the 3 next layers, the measured weight gains were in the same range. However, from the fourth layer, it was observed that the growth of the multilayer system in concentrated conditions was approximately twice that in diluted conditions. The weight gain due to LbL assembly in the concentrated conditions after 12 layers deposition was WG = 18.4 wt%, while this value reached only WG = 6.4 wt% in the semi diluted system. After 20 layers, the total weight gain measured was WG = 47 wt%, including 27.4 wt% due to LbL assembly, and 19.6 wt% to the thermofixed polyCTR- β CD layer.

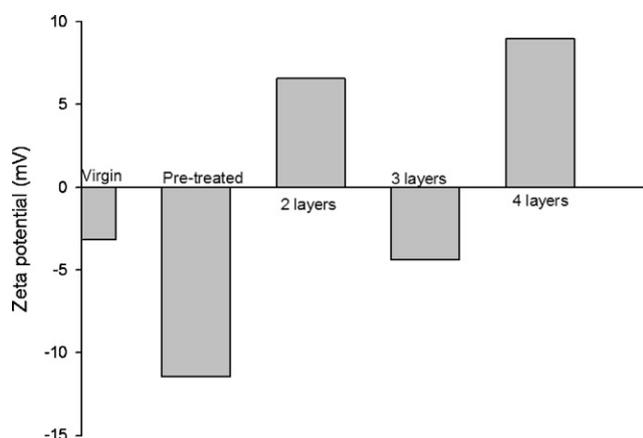


Fig. 8. Evolution of the zeta potential of samples with the number of layers (for 4 layers) deposited on the textile surface at pH = 4.

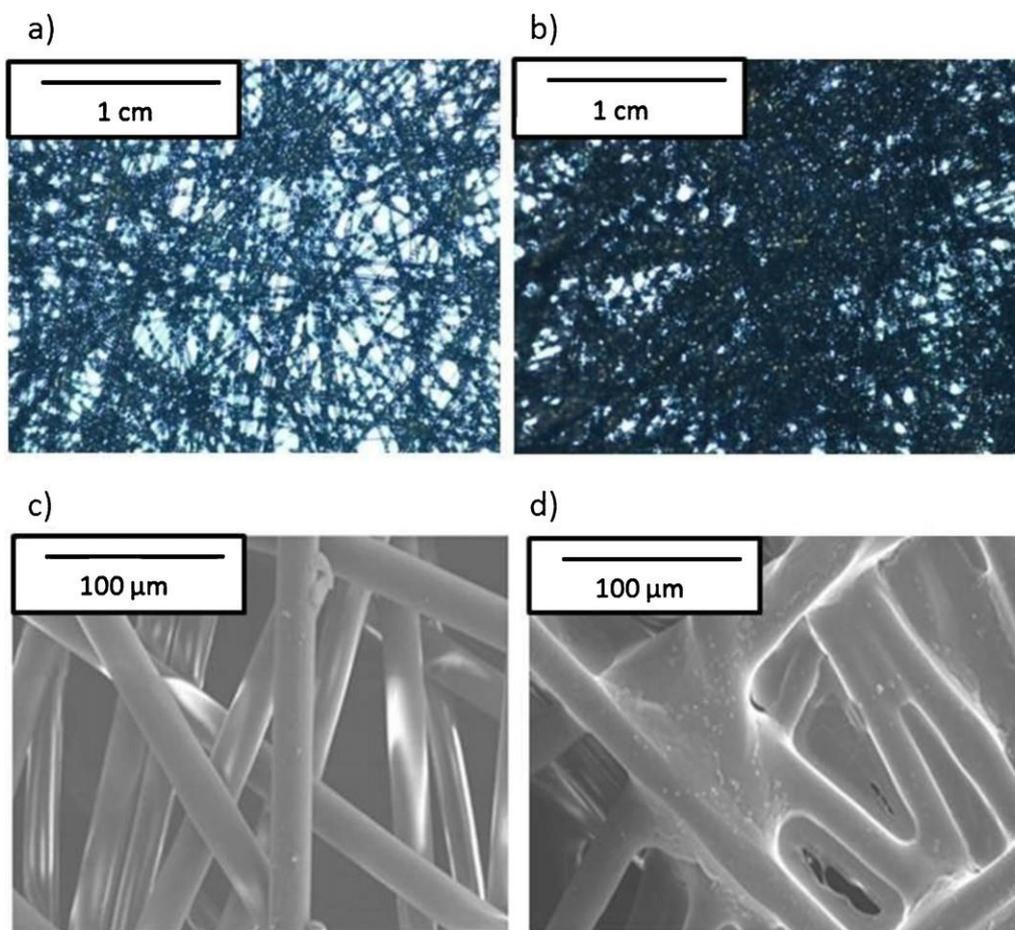


Fig. 9. Optical microscopy images (5 \times) of non-treated PET (a) and PET with 4 layers (b) and SEM images of non-treated PET 450 \times (c) and PET with 4 layers 400 \times (d).

Those values correspond to an average weight increase of 1.4% per absorbed layer without any distinction between their cationic or anionic nature.

Fig. 7 shows the comparative study of the quantification of deposited chitosan by weight gain and acid orange titration after deposition of 3, 5 and 11 layers onto pre-treated support. Acid orange titration displayed increasing amounts of chitosan deposited with the number of layers (1.5%, 2.1%, and 6.7% respectively). The same behavior was observed with gravimetric analysis, especially for the highest chitosan contents of the supports which confirms the formation of the multilayer assembly.

3.2.1. Zetametry

Fig. 8 shows evolution of the zeta potential of the textile surface over the first steps of its modification. The study was carried out at pH = 4 where both chitosan and polyCTR- β CD are in their ionic form (pKa $\text{NH}_3^+/\text{NH}_2 = 6.2\text{--}7.32$ for chitosan (Lee, Lim, Chong, & Shim, 2009), pKa $\text{COOH}/\text{COO}^- = 5.2\text{--}7.9$ for polyCTR- β CD). At pH = 4, non-treated PET presented a negative zeta potential (-3 mV) in accordance with previous results (Smole et al., 2002), due to hydrophobicity of PET. After thermofixation, zeta potential decreased to -11 mV due to presence of carboxylate groups in the crosslinked polyCTR- β CD layer. A first reversal was observed after chitosan deposition ($+6$ mV) on the previous layer through electrostatic interactions. Then, a second reversal occurred upon the first self-assembled polyCTR- β CD layer (-4 mV) deposition. The difference of the extent of the zeta potential values between thermofixed and self-assembled layers are due to the difference between the carboxylate groups density brought through the thermofixation step on one hand, and those brought by ionic interactions in the LbL method on the other hand.

As a matter of fact, the weight increase due to pre-treatment by thermofixation was in the range of 20 wt% while it was only 1.4 wt% in the case of the LbL process, as mentioned above. Finally, the second chitosan self-assembled layer presented again a positive zeta potential ($+9$ mV). These results confirmed the alternation of anionic and cationic layers on the textile surface upon the repeated cycles of the process.

3.2.2. Microscopy characterization

Images obtained from optical microscopy (Fig. 9a and b) clearly shows a reduction of the pore size of the textile structure upon treatment.

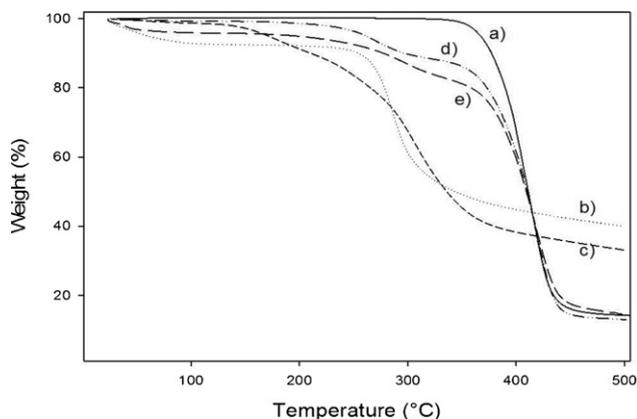


Fig. 10. TGA plots (5 $^{\circ}$ C/min, under nitrogen atmosphere) of virgin PET (a), chitosan (b), polyCTR- β CD (c), pre-treated PET by pad-dry-cure (150 $^{\circ}$ C - 30 min) (d), and pre-treated PET with 20 layers (e).

This functionalization was further demonstrated by SEM (Fig. 9c and d) where one can observe a significant polymer deposition onto the fibres with a partial filling of the gaps.

3.2.3. Thermogravimetric analysis

Fig. 10 shows the TGA curves (5 °C/min) of the virgin PET (a), chitosan powder (b), polyCTR-βCD powder (c), pre-treated PET by thermofixation (initial WG = 19.6 wt% determined by weighing) (d) and PET with 20 layers (c1 = [chitosan] = 0.5% w/v, c2 = [polyCTR-βCD] = 0.4% w/v, WG = 46.6 wt% determined by weighing) (e). Below 200°C, the small loss of mass observed could be attributed to the polymers dehydration. Thermal degradation of untreated PET started at 350 °C, while that of chitosan and polyCTR-βCD started at 250 °C and 150 °C respectively. Due to the difference of the degradation temperature range between the raw support and the coating polymers, the degradation profiles of the pre-treated and 20 layers treated PET showed an evolution that clearly evidenced the functionalization of the textile by the polyelectrolytes through a weight loss appearing at 250 °C on the corresponding curves.

3.2.1. FTIR analysis

As observed in Fig. 11, infrared spectra of polyCTR-βCD and chitosan present both the characteristic bands of polysaccharides: elongation of hydroxyl, amino (CHT) and carboxylic (polyCTR-βCD) groups are revealed by the broad absorption bands at 3300 cm⁻¹. A combination of the elongation of COOH and ester (COOR) groups of polyCTR-βCD may be visualized at 1700 cm⁻¹ and finally at 1100 cm⁻¹ the anomeric and inter-glycosidic C-O-C

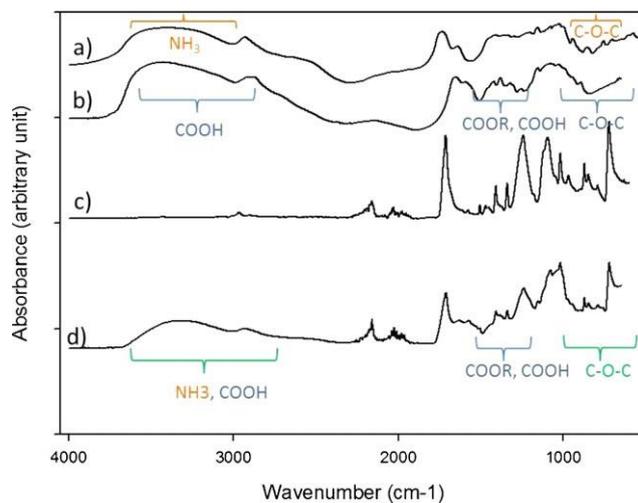


Fig. 11. FTIR spectra of chitosan powder from KBr pellets (a), polyCTR-βCD powder from KBr pellets (b), ATR spectra of virgin PET (c) and ATR spectra of PET with 20 layers (d).

links elongation are also clearly visible on both spectra. Changes between non-treated PET and 20 layers PET display the presence of both polyelectrolytes on the support through the appearance of the large bands mentioned above, mixed to the characteristic bands of the polyethylene terephthalate support.

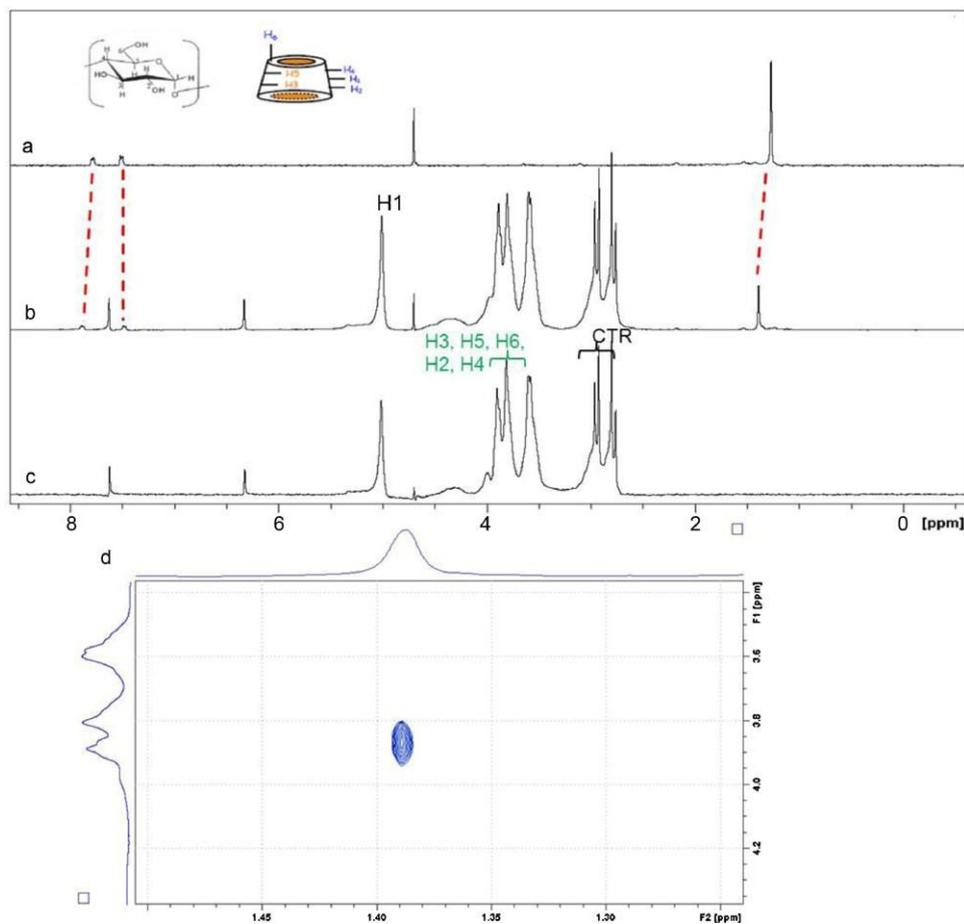


Fig. 12. (1) ¹H NMR in D₂O of (a) TBBA; (b) TBBA-polyCTR-βCD complex and (c) polyCTR-βCD and (2) 2D-Noesy NMR spectrum focused on the cyclodextrin protons of polyCTR-βCD (vertical) and the tertibutyl signal of TBBA (horizontal) in D₂O.

3.3. Building of the TBBA loaded multilayer system

3.3.1. NMR study of the polyCTR- β CD/TBBA complex

A proton NMR study was developed in order to evidence the complexation between TBBA and polyCTR- β CD. Spectrum in Fig. 12a displays the NMR spectrum of TBBA where aromatic (doublets 7.45–7.52 and 7.77–7.79 ppm) and protons belonging to the tertibutyl group (singlet 1.27 ppm) is observed. Besides, spectrum in Fig. 12c relative to polyCTR- β CD displayed the signal of the glucopyranosic units of cyclodextrins, H1 at 5.01 ppm, H3, H5, H6, H4 and H2 situated between 3.58 and 3.99 ppm, the methylene groups of the citrate crosslinks appearing between 2.76 and 2.96 ppm. Finally two singlets at 6.32 and 7.62 ppm corresponding to cis and trans aconitic esters, respectively. The latter species were issued from a side reaction consisting of the dehydration of citrate crosslinks (Wyrzykowski, Hebanowska, Nowak-Wicz, Makowski, & Chmurzynski, 2011). Based on the integrations values of H1 (CD) and citrate methylene signals, we could calculate that one CD moiety was substituted in average by 5 citrate crosslinks. This also meant that the weight ratio of cyclodextrin moieties in polyCTR- β CD was close to 50% while the remaining part corresponded to the citrate crosslinks.

The spectrum in Fig. 12b is relative to the TBBA-polyCTR- β CD mixture, where the aromatic protons of TBBA shifted upfield and downfield to 7.47–7.49 and 7.87–7.89 ppm, and the tertibutyl signal shifted downfield to 1.39 ppm. As observed in Fig. 12d, the 2D NOESY NMR Spectrum obtained from the NOESY sequence displays a correlation due to the dipolar interaction between the TBBA tertibutyl group (1.39 ppm) and the H3 of β CD situated inside the cavity (3.86 ppm). Despite no evident interaction displayed between the aromatic part of TBBA and H3 or H5 protons of β CD (area not displayed in Fig. 12), this study clearly confirmed the inclusion complexation of TBBA in the cyclodextrin polymer.

3.3.2. Multilayer build-up

The TBBA loaded multilayer system was built onto the pre-treated textile by alternative dipping in chitosan and polyCTR- β CD/TBBA complex solutions. Fig. 6 shows the evolution of the weight gain of the assembly, in comparison with the TBBA free system mentioned above. It is observed that the weight increase after each impregnation step in both solutions was sharply lowered in the presence of TBBA. As a matter of fact, results display that after thermofixation and 18 deposited layers, the total WG of the fabric was only 34.8 wt% in the presence of TBBA, against 44.8 wt% in TBBA free conditions. Considering that the contribution of pre-treatment corresponded to 19.6 wt%, the WG due to the

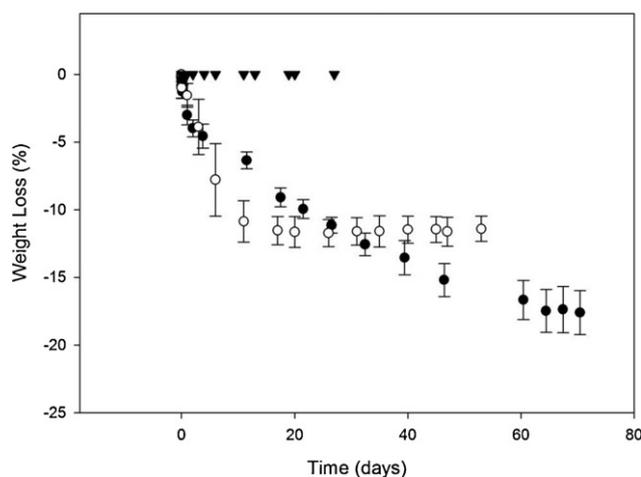


Fig. 13. Degradation of treated samples as a function of their weight loss against time in distilled water at 37°C; (▼) virgin PET; (●) 20 layers, [chitosan] = 5 g/L in 10 mL/L HAc and [polyCTR- β CD] = 4 g/L in H₂O; (○) 20 layers + TBBA, [chitosan] = 5 g/L in 10 mL/L HAc and [polyCTR- β CD] = 4 g/L + 50 mg/L TBBA in H₂O.

self-assembled layers was 25.2% when free polyCTR- β CD was used, against 15.2% for the TBBA-polyCTR- β CD complex. In parallel, OWLS modelling results presented in Fig. 4d confirmed this tendency in a lesser extent than that observed on the textile support. These results showed that for constant polyelectrolyte concentrations, TBBA disturbed the assembly of the system. This difference may be explained by the fact that inclusion of TBBA inside the cyclodextrin cavities may decrease the hydrophilic character of polyCTR- β CD, as a consequence, interactions with the next chitosan layer would be decreased, and thereby the build-up of the whole assembly would be affected.

3.3.3. Stability of the multilayer assembly

The stability of the multilayer coating was followed by evolution of the sample weight immersed in water batches under stirring at 37 °C against time (Fig.13).

The degradation of the samples that only underwent a pre-treatment step occurred within the 15 first days, corresponding to 12 wt% of the initial weight of the samples. This result displayed the degradation of the thermofixed layer through the esterolysis of the crosslinks. We can note that this degradation was not complete as the initial WG of the sample after pre-treatment was 19.6 wt%.

Besides, the extent of the weight loss of samples modified with 20 layers reached 17.8 wt% within 70 days. This degradation was slower than that observed on the only pre-treated sample, indicating

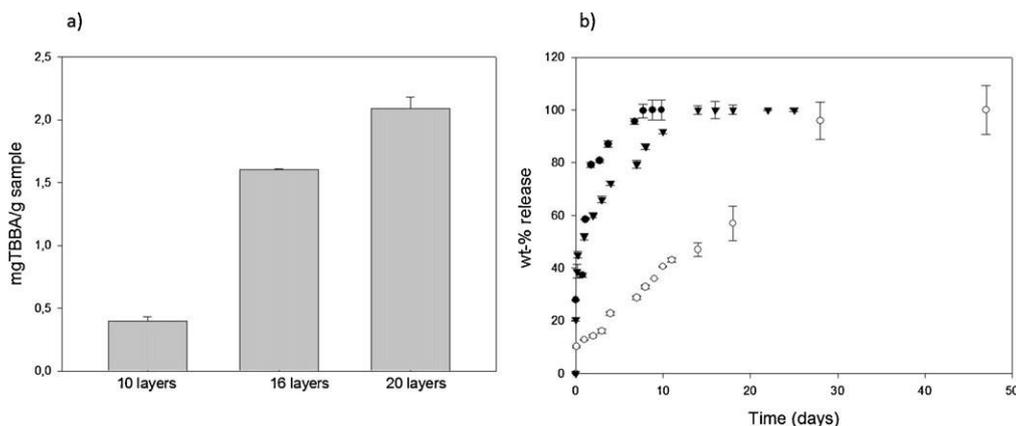


Fig. 14. (a) TBBA in mg per gram of sample adsorbed and released from samples treated with 10, 16 and 20 layers in water at 37 °C under stirring; (b) release kinetic study of TBBA from treated samples: (●) 10 layers; (▼) 16 layers; (○) 20 layers expressed in percentage with regard to data from (a).

the relative stabilization of the assembly by the chitosan layers in the coating. As the initial WG of this series was 47 wt% after functionalization, it can be deduced that this value decreased down to 29 wt% after 70 days. Concerning TBBA loaded samples coated with 20 layers, a weight loss was clearly observed within the first 10 days (10.9%), and then continued with a slower rate indicating the potentiality of such system to operate as drug delivery system. In this context, the kinetics of release of TBBA was assessed in order to evaluate the drug-delivery properties of those new systems.

3.3.4. Release studies

A release study of TBBA from samples treated with 10, 16 and 20 layers was assessed in water at 37 °C. The maximal loading capacity of these three series of samples was calculated from the plateau values of each experiment and reported in Fig. 14a. Though TBBA preliminarily loaded onto the samples increased with the number of layers, the evolution did not obey to a strict proportionality rule. This result was due to the fact that increased amounts of both polyelectrolytes were adsorbed on the surface as the number of layers increased within the investigated range, as observed in the OWLS study.

Fig. 14b indicates that all immobilized TBBA onto treated textile samples was released within 7, 14 and 27 days for samples treated with 10, 16 and 20 layers, respectively. These results indicate that the release kinetics of TBBA could be controlled by the number of layers. As no direct correlation was observed with the degradation kinetics study mentioned above, it can be deduced that TBBA release was controlled by diffusion phenomena through the multilayer assembly rather than by the erosion of the multilayer system.

6. Conclusion

In this paper, we showed the possibility to build a drug delivery system based on the coating of multilayer incorporating a β -cyclodextrin polymer and chitosan, as negative and positive polyelectrolytes respectively. After monitoring this binary system by using the OWLS technique, it was applied to a PET non-woven textile after a pre-treatment aiming to give an ionic character to the latter, allowing the further deposition of the multilayer coating. Up to 20 layers could be superimposed, with or without TBBA as model bioactive model molecule in the system. A lesser amount of both polyelectrolytes were fixed on the support in presence of TBBA, due to a change in the hydrophilicity of the cyclodextrin polymer containing layers. It was observed that TBBA loading and its release time were both directly linked to the number of self-assembled layers present in the systems. As the degradation of the multilayer assembly in water batches occurred with a different kinetic, it was deduced that TBBA was released by diffusion process through the multilayer coating indicating the potentiality of such systems to operate in drug delivery applications. After this preliminary study, the use of a higher molecular weight chitosan and the influence of a crosslinking reaction step will be investigated in order to better control both the degradation of the multilayer coating and the diffusion of the model drug inside this structure. Our ultimate goal will be to extend this concept to the functionalization of more well defined medical devices incorporating drugs, like antibiotics or antiseptic agents. These results will be published in due course.

Acknowledgements

Thanks to the University of Lille 1 who supported this work by awarding a PhD grant to the first author of this paper. The zeta potential measurements were developed by Mr. L. Royer in the frame of his end course of engineering studies cursus, supervised by Prof. Christine Campagne in the premises of Ecole Nationale

Supérieure des Arts et Industries Textiles (ENSAIT), Roubaix, France.

References

- Abdelkebir, K., Gaudiere, F., Morin-Grognet, S., Coquerel, G., Labat, B., Atmani, H., et al. (2011). Evidence of different growth regimes coexisting within biomimetic layer-by-layer films. *Soft Matter*, 7(19), 9197–9205.
- Auzély-Velty, R., & Rinaudo, M. (2001). Chitosan derivatives bearing pendant cyclodextrin cavities: Synthesis and inclusion performance. *Macromolecules*, 34(11), 3574–3580.
- Bakkour, Y., Vermeersch, G., Morcellet, M., Boschin, F., Martel, B., & Azaroual, N. (2006). Formation of cyclodextrin inclusion complexes with doxycycline-hyclate: NMR investigation of their characterisation and stability. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 54(1), 109–114.
- Benkirane-Jessel, N., Schwinté, P., Falvey, P., Darcy, R., Haïkel, Y., Schaaf, P., et al. (2004). Build-up of polypeptide multilayer coatings with anti-inflammatory properties based on the embedding of piroxicam-cyclodextrin complexes. *Advanced Functional Materials*, 14(2), 174–182.
- Bhardwaj, N., & Kundu, S. C. (2011). Silk fibroin protein and chitosan polyelectrolyte complex porous scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, 85(2), 325–333.
- Blanchemain, N., Haulon, S., Martel, B., Traisnel, M., Morcellet, M., & Hildebrand, H. F. (2005). Vascular PET prostheses surface modification with cyclodextrin coating: Development of a new drug delivery system. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 29(6), 628–632.
- Blanchemain, N., Haulon, S., Boschin, F., Marcon-Bachari, E., Traisnel, M., Morcellet, M., et al. (2007). Vascular prostheses with controlled release of antibiotics: Part 1. Surface modification with cyclodextrins of PET prostheses. *Biomolecular Engineering*, 24(1), 149–153.
- Blanchemain, N., Laurent, T., Haulon, S., Traisnel, M., Neut, C., Kirkpatrick, J., et al. (2007). In vitro study of a HP β -cyclodextrin grafted PET vascular prosthesis for application as anti-infectious drug delivery system. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57(1), 675–681.
- Blanchemain, N., Karrout, Y., Tabary, N., Neut, C., Bria, M., Siepmann, J., et al. (2011). Methyl- β -cyclodextrin modified vascular prosthesis: Influence of the modification level on the drug delivery properties in different media. *Acta Biomaterialia*, 7(1), 304–314.
- Boschin, F., Blanchemain, N., Bria, M., Delcourt-Debruyne, E., Morcellet, M., Hildebrand, H. F., et al. (2006). Improved drug delivery properties of PVDF membranes functionalized with β -cyclodextrin—Application to guided tissue regeneration in periodontology. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, 79A(1), 78–85.
- Brusatori, M. A., & Van Tassel, P. R. (2003). Biosensing under an applied voltage using optical waveguide lightmode spectroscopy. *Kidlington: ROYAUME-UNI, Elsevier*.
- Burke, S. E., & Barrett, C. J. (2003). pH-responsive properties of multilayered poly(L-lysine)/hyaluronic acid surfaces. *Biomacromolecules*, 4(6), 1773–1783.
- Caruso, F., Niikura, K., Furlong, D. N., & Okahata, Y. (1997). Assembly of alternating polyelectrolyte and protein multilayer films for miminoseensing. *Langmuir*, 13(13), 3427–3433.
- Chen, W., & McCarthy, T. J. (1997). Layer-by-layer deposition: A tool for polymer surface modification. *Macromolecules*, 30(1), 78–86.
- Connors, K. A. (1997). The stability of cyclodextrin complexes in solution. *Chemical Reviews* (Washington, DC, United States), 97(5), 1325–1358.
- Costa-Júnior, E. S., Barbosa-Stancioli, E. F., Mansur, A. A. P., Vasconcelos, W. L., & Mansur, H. S. (2009). Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 76(3), 472–481.
- Decher, G. (1997). Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science*, 277(5330), 1232–1237.
- Decher, G., Hong, J. D., & Schmitt, J. (1992). Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films*, 210–211, Part 2(0), 831–835.
- Decher, G., & Schmitt, J. (1992). Fine-tuning of the film thickness of ultrathin multilayer films composed of consecutively alternating layers of anionic and cationic polyelectrolytes. *Trends in Colloid and Interface Science VI*, 89, 160–164.
- Degoutin, S., Jimenez, M., Casetta, M., Bellayer, S., Chai, F., Blanchemain, N., et al. (2012). Anticoagulant and antimicrobial finishing of non-woven polypropylene textiles. *Biomedical Materials*, 7(3).
- Deng, H., Zhou, X., Wang, X., Zhang, C., Ding, B., Zhang, Q., et al. (2010). Layer-by-layer structured polysaccharides film-coated cellulose nanofibrous mats for cell culture. *Carbohydrate Polymers*, 80(2), 475–480.
- Dubacheva, G. V., Dumy, P., Auzély, R., Schaaf, P., Boulmedais, F., Jerry, L., et al. (2010). Unlimited growth of host-guest multilayer films based on functionalized neutral polymers. *Soft Matter*, 6(16), 3747–3750.
- Dubas, S. T., & Schlenoff, J. B. (2001). Polyelectrolyte multilayers containing a weak polyacid: Construction and deconstruction. *Macromolecules*, 34(11), 3736–3740.
- Ducoroy, L., Bacquet, M., Martel, B., & Morcellet, M. (2007). Ion exchange textiles from the finishing of PET fabrics with cyclodextrins and citric acid for the sorption of metallic cations in water. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57(1–4), 271–277.
- Ducoroy, L., Martel, B., Bacquet, M., & Morcellet, M. (2007). Cation exchange finishing of nonwoven polyester with polycarboxylic acids and cyclodextrins. *Journal of Applied Polymer Science*, 103(6), 3730–3738.

- Ducoroy, L., Bacquet, M., Martel, B., & Morcellet, M. (2008). Removal of heavy metals from aqueous media by cation exchange nonwoven PET coated with β -cyclodextrin-polycarboxylic moieties. *Reactive and Functional Polymers*, 68(2), 594–600.
- Eggleston, C. M., Vörös, J., Shi, L., Lower, B. H., Droubay, T. C., & Colberg, P. J. S. (2008). Binding and direct electrochemistry of Omca, an outer-membrane cytochrome from an iron reducing bacterium, with oxide electrodes: A candidate biofuel cell system. *Inorganica Chimica Acta*, 361(3), 769–777.
- El Ghoul, Y., Blanchemain, N., Laurent, T., Campagne, C., El Achari, A., Roudesli, S., et al. (2008). Chemical, biological and microbiological evaluation of cyclodextrin finished polyamide inguinal meshes. *Acta Biomaterialia*, 4(5), 1392–1400.
- Elvin, C. M., Vuocolo, T., Brownlee, A. G., Sando, L., Huson, M. G., Liyou, N. E., et al. (2010). A highly elastic tissue sealant based on photopolymerised gelatin. *Bio-materials*, 31(32), 8323–8331.
- Franklin, J. E., Marler, J. J., Byrne, M. T., Melvin, A. J., Clarkson, S. J., & Melvin, D. B. (2009). Fiber technology for reliable repair of skeletal muscle. *Journal of Biomedical Materials Research – Part B: Applied Biomaterials*, 90B(1), 259–266.
- Franz, S., Rammelt, S., Scharnweber, D., & Simon, J. C. (2011). Immune responses to implants – A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials*, 32(28), 6692–6709.
- Fu, J., Ji, J., Yuan, W., & Shen, J. (2005). Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan. *Biomaterials*, 26(33), 6684–6692.
- García-González, C. A., Alnaief, M., & Smirnova, I. (2011). Polysaccharide-based aerogels – Promising biodegradable carriers for drug delivery systems. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), 1425–1438.
- Gendron, R., Kumar, M. R., Paradis, H., Martin, D., Ho, N., Gardiner, D., et al. (2012). Controlled cell proliferation on an electrochemically engineered collagen scaffold. *Macromolecular Bioscience*, 12(3), 360–366.
- Gray, J. J. (2004). The interaction of proteins with solid surfaces. *Current Opinion in Structural Biology*, 14(1), 110–115.
- Gribova, V., Auzely-Velty, R., & Picart, C. (2011). Polyelectrolyte multilayer assemblies on materials surfaces: From cell adhesion to tissue engineering. *Chemistry of Materials*, 24(5), 854–869.
- Hamerli, P., Weigel, T., Groth, T., & Paul, D. (2003). Surface properties of and cell adhesion onto allylamine-plasma-coated polyethylene terephthalat membranes. *Biomaterials*, 24(22), 3989–3999.
- Jang, Y., Akgun, B., Kim, H., Satija, S., & Char, K. (2012). Controlled release from model blend multilayer films containing mixtures of strong and weak polyelectrolytes. *Macromolecules*, 45(8), 3542–3549.
- Joudieh, S., Bon, P., Martel, B., Skiba, M., & Lahiani-Skiba, M. (2009). Cyclodextrin polymers as efficient solubilizers of alendazole: Complexation and physico-chemical characterization. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9(1), 132–140.
- Karimpil, J. J., Melo, J. S., & D'Souza, S. F. (2012). Immobilization of lipase on cotton cloth using the layer-by-layer self-assembly technique. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(1), 300–302.
- Köstler, S., Ribitsch, V., Stana-Kleinschek, K., Jakopic, G., & Strnad, S. (2005). Electrokinetic investigation of polyelectrolyte adsorption and multilayer formation on a polymer surface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 270–271(1–3), 107–114.
- Kurrrat, R., Textor, M., Ramsden, J. J., Boni, P., & Spencer, D. N. (1997). Instrumental improvements in optical waveguide light mode spectroscopy for the study of biomolecule adsorption. *Review of Scientific Instruments*, 68(5), 2172–2176.
- Kurrrat, R., Prenosil, J. E., & Ramsden, J. J. (1997). Kinetics of human and bovine serum albumin adsorption at silica–titania surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 185(1), 1–8.
- Laurent, T., Kacem, I., Blanchemain, N., Cazaux, F., Neut, C., Hildebrand, H. F., et al. (2011). Cyclodextrin and maltodextrin finishing of a polypropylene abdominal wall implant for the prolonged delivery of ciprofloxacin. *Acta Biomaterialia*, 7(8), 3141–3149.
- Lavalle, P., Gergely, C., Cuisinier, F. J. G., Decher, G., Schaaf, P., Voegel, J. C., et al. (2002). Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime: An in situ atomic force microscopy study. Washington, DC: ETATS-UNIS, American Chemical Society.
- Lawrence, N. J., Wells-Kingsbury, J. M., Ihrig, M. M., Fangman, T. E., Namavar, F., & Cheung, C. L. (2012). Controlling *E. coli* adhesion on high-k dielectric bioceramics films using poly(amino acid) multilayers. *Langmuir*, 28(9), 4301–4308.
- Lee, D. W., Lim, H., Chong, H. N., & Shim, W. S. (2009). Advances in chitosan material and its hybrid derivatives: A review. *Open Biomaterials Journal*, 1, 10–20.
- Leprière, S., Boschin, F., Tabary, N., Briä, M., Martel, B., Blanchemain, N., et al. (2007). Guided tissue regeneration membranes with controlled delivery properties of chlorhexidine by their functionalization with cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57(1), 297–302.
- Leprière, S., Chai, F., Hornez, J. C., Vermet, G., Neut, C., Descamps, M., et al. (2009). Prolonged local antibiotics delivery from hydroxyapatite functionalised with cyclodextrin polymers. *Biomaterials*, 30(30), 6086–6093.
- Li, J., Xiao, H., Li, J., & Zhong, Y. (2004). Drug carrier systems based on water-soluble cationic [beta]-cyclodextrin polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 278(2), 329–342.
- Lin, Q. K., Ren, K. F., & Ji, J. (2009). Hyaluronic acid, chitosan-DNA complex multilayered thin film as surface-mediated nonviral gene delivery system. *Colloids, Surfaces B: Biointerfaces*, 74(1), 298–303.
- Lofstson, T., & Brewster, M. E. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins: 1. Drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(10), 1017–1025.
- Lvov, Y., Decher, G., & Moehwald, H. (1993). Assembly, structural characterization, and thermal behavior of layer-by-layer deposited ultrathin films of poly(vinyl sulfate) and poly(allylamine). *Langmuir*, 9(2), 481–486.
- Lvov, Y., Ariga, K., Ichinose, I., & Kunitake, T. (1995). Assembly of multicomponent protein films by means of electrostatic layer-by-layer adsorption. *Journal of the American Chemical Society*, 117(22), 6117–6123.
- Martel, B., Morcellet, M., Ruffin, D., Ducoroy, L., & Weltrowski, M. (2002). Finishing of polyester fabrics with cyclodextrins and polycarboxylic acids as crosslinking agents. *Journal of Inclusion Phenomena*, 44(1–4), 443–446.
- Martel, B., Morcellet, M., & Weltrowski, M. (2002). Cyclodextrin polymers and/or cyclodextrin derivatives with complexing properties and ion exchange. Properties and method for the production thereof US 6,660,804 B1, 2003.
- Martel, B., Weltrowski, M., Ruffin, D., & Morcellet, M. (2002). Polycarboxylic acids as crosslinking agents for grafting cyclodextrins onto cotton and wool fabrics: Study of the process parameters. *Journal of Applied Polymer Science*, 83(7), 1449–1456.
- Martel, B., Ruffin, D., Weltrowski, M., Lekchiri, Y., & Morcellet, M. (2005). Water-soluble polymers and gels from the polycondensation between cyclodextrins and poly(carboxylic acid)s: A study of the preparation parameters. *Journal of Applied Polymer Science*, 97(2), 433–442.
- Ngankam, A. P., Mao, G., & Van Tassel, P. R. (2004). Fibronectin adsorption onto polyelectrolyte multilayer films. *Langmuir*, 20(8), 3362–3370.
- Ngankam, A. P., & Van Tassel, P. R. (2005). In situ layer-by-layer film formation kinetics under an applied voltage measured by optical waveguide lightmode spectroscopy. *Langmuir*, 21(13), 5865–5871.
- Nițescu, M., Dumitriu, A. S., Dumitru, S. G., Trăistaru, M., & Burlibaș, A. M. (2012). Surface treatment methods for titanium implants. *Metallurgia International*, 17(6), 147–150.
- Pedroni, V. I., Gschaidner, M. E., & Schulz, P. C. (2003). UV spectrophotometry: Improvements in the study of the degree of acetylation of chitosan. *Macromolecular Bioscience*, 3(10), 531–534.
- Picart, C., Ladam, G., Senger, B., Voegel, J. C., Schaaf, P., Cuisinier, F. J. G., et al. (2001). Determination of structural parameters characterizing thin films by optical methods: A comparison between scanning angle reflectometry and optical waveguide lightmode spectroscopy. *Journal of Chemical Physics*, 115(2), 1086–1094.
- Rajewski, R. A., & Stella, V. J. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins: 2. In vivo drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(11), 1142–1169.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 31(7), 603–632.
- Scott, E. A., Nichols, M. D., Cordova, L. H., George, B. J., Jun, Y.-S., & Elbert, D. L. (2008). Protein adsorption and cell adhesion on nanoscale bioactive coatings formed from poly(ethylene glycol) and albumin microgels. *Biomaterials*, 29(34), 4481–4493.
- Seantier, B. A., & Deratani, A. (2012). Ionic interactions in natural and synthetic macromolecules. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.
- Semenov, A., Charlot, A., Auzely-Velty, R., & Rinaudo, M. (2007). Rheological properties of binary associating polymers. *Rheologica Acta*, 46(5), 541–568.
- Smole, M., Stana-Kleinschek, K., Ribitsch, V., Pointner, B., Zipper, P., Stakne, K., et al. (2002). Electrokinetic properties of surface modified PETP fibres. *Materials Research Innovations*, 6(1), 19–23.
- Sun, T., Guo, Q., Zhang, C., Hao, J., Xing, P., Su, J., et al. (2012). Self-assembled vesicles prepared from amphiphilic cyclodextrins as drug carriers. *Langmuir*, 28(23), 8625–8636.
- Tabary, N., Leprière, S., Boschin, F., Blanchemain, N., Neut, C., Delcourt-Debruyne, E., et al. (2007). Functionalization of PVDF membranes with carbohydrate derivatives for the controlled delivery of chlorhexidine. *Biomolecular Engineering*, 24(5), 472–476.
- Tang, W., Zhao, J., Sha, B., & Liu, H. (2012). Adsorption and drug release based on β -cyclodextrin-grafted hydroxyapatite composite. *Journal of Applied Polymer Science*, 127(4), 2803–2808.
- Teo, E. Y., Ong, S. Y., Khoon Chong, M. S., Zhang, Z., Lu, J., Mochhala, S., et al. (2011). Polycaprolactone-based fused deposition modeled mesh for delivery of antibacterial agents to infected wounds. *Biomaterials*, 32(1), 279–287.
- Tie, Y., Calonder, C., & Van Tassel, P. R. (2003). Protein adsorption: Kinetics and history dependence. *Journal of Colloid and Interface Science*, 268(1), 1–11.
- Tiefenthaler, K., & Lukosz, W. (1989). Sensitivity of grating couplers as integrated-optical chemical sensors. Washington, DC: ETATS-UNIS, Optical Society of America.
- Uchida, E., Uyama, Y., & Ikada, Y. (1993). Sorption of low-molecular-weight anions into thin polycation layers grafted onto a film. *Langmuir*, 9(4), 1121–1124.
- Uekama, K., Hirayama, F., & Irie, T. (1998). Cyclodextrin drug carrier systems. *Chemical Reviews (Washington, DC, United States)*, 98(5), 2045–2076.
- Venkatesan, J., Ryu, B., Sudha, P. N., & Kim, S. K. (2012). Preparation and characterization of chitosan-carbon nanotube scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(2), 393–402.
- Vörös, J., Ramsden, J. J., Csúcs, G., Szendrő, I., De Paul, S. M., Textor, M., et al. (2002). Optical grating coupler biosensors. *Biomaterials*, 23(17), 3699–3710.
- Wang, Q., & Hauser, P. (2009). New characterization of layer-by-layer self-assembly deposition of polyelectrolytes on cotton fabric. *Cellulose*, 16(6), 1123–1131.
- Weickenmeier, M., Wenz, G., & Huff, J. (1997). Association thickener by host guest interaction of a β -cyclodextrin polymer and a polymer with hydrophobic side-groups. *Macromolecular Rapid Communications*, 18(12), 1117–1123

Weisser, M., Nelles, G., Wenz, G., & Mittler-Neher, S. (1997). Guest–host interactions with immobilized cyclodextrins. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 38(1–3), 58–67.

Wenz, G., Strassnig, C., Thiele, C., Engelke, A., Morgenstern, B., & Hegetschweiler, K. (2008). Recognition of ionic guests by ionic β -cyclodextrin derivatives. *Chemistry: A European Journal*, 14(24), 7202–7211.

Wittmer, C. R., Phelps, J. A., Saltzman, W. M., & Van Tassel, P. R. (2007). Fibronectin terminated multilayer films: Protein adsorption and cell attachment studies. *Biomaterials*, 28(5), 851–860.

Wyrzykowski, D., Hebanowska, E., Nowak-Wicz, G., Makowski, M., & Chmurzyński, L. (2011). Thermal behaviour of citric acid and isomeric aconitic acids. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 104(2), 731–735.

Article 2 : Projet d'article

Build-up of an antimicrobial multilayer coating on a textile support based on a methylene blue – poly(cyclodextrin) complex

Adeline Martin^a, Nicolas Tabary^a, Feng Chai^c, Laurent Leclercq^b, Jatupol Junthip^a, François Aubert-Viard^c, Christel Neut^d, Marek Weltrowski^e, Nicolas Blanchemain^c, Bernard Martel^{a}*

^a Université Lille 1, Unité Matériaux et Transformations (UMET) UMR CNRS 8207, Villeneuve d'Ascq, France

^b Université Montpellier 1 and 2, Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) UMR CNRS 5247, Montpellier, France

^c INSERM U 1008, Controlled Drug Delivery Systems and Biomaterials, Lille, France

^d Inserm U995 - Team 1, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Lille, France

^e Cegep Saint Hyacinthe, 3000 Boullé, J2S1H9, Quebec, Canada

➤ **Soumis au journal *Biomedical Material*, le 10 Juillet 2013 – en cours de révision**

Annexes

ANNEXE 1

- Détermination du degré de désacétylation (DD) des chitosans -

1. Par IR

La littérature présente les bandes d'absorption qui peuvent être utilisées pour déterminer le DD du chitosan^{220,285} mais certaines permettent une meilleure reproductibilité des résultats. La poudre de CHT est préalablement séchée à 90°C pendant 10 min puis 1 mg est broyé finement dans un mortier avec 100 mg de KBr. Le mélange est pressé en pastilles (100 kN) et celles-ci sont séchées pendant 24h dans un four à 80°C. Les spectres sont obtenus selon la même technique que celle décrite dans la Partie II, **IV.4. Spectroscopie Infrarouge**. On utilise ensuite l'équation fournie par la littérature²⁸⁵ qui correspond aux bandes d'absorbance à 1320 et 1420 cm⁻¹ et qui sont les bandes dont les résultats sont les plus proches de ceux déterminés par les autres méthodes et donc les plus fiables.

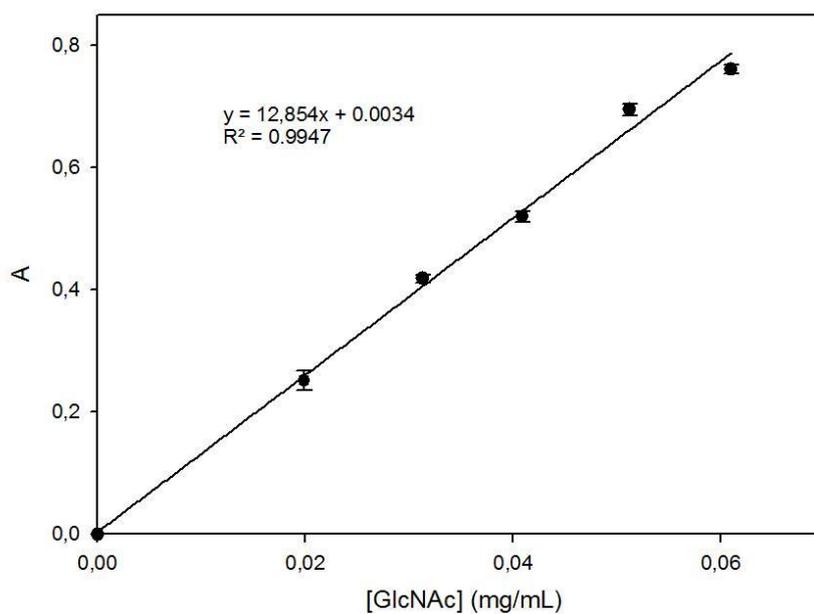
$$\frac{A_{1320}}{A_{1420}} = 0.3822 + 0.03133 DA$$

On obtient le degré d'acétylation (DA) du chitosan et, par $DD(\%) = 100 - DA(\%)$, on remonte au degré de désacétylation du chitosan.

2. Par UV

La spectrophotométrie UV est utilisée ici car c'est une technique facile à mettre en œuvre et peu chère. Le solvant choisi est une solution aqueuse d'acide chlorhydrique selon les travaux de Pedroni *et al.*²⁸⁶. En effet, les résultats dans l'acide acétique ont montré peu de reproductibilité et cette technique est peu adaptée aux forts degrés de désacétylation.

Tout d'abord, une courbe de calibration présentée ci-après est réalisée (5 mesures par point). La N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) dans une solution de HCl à 0,1 M est utilisée comme référence à des concentrations comprises entre 0,02 et 0,06 mg/mL et l'absorbance est mesurée à 201 nm.



Courbe de calibration de la GlcNac dans HCl 0.1M à 201nm

Afin de déterminer le degré de désacétylation du chitosan, une solution à 0,3 mg/mL est préparée dans HCl 0,1 M. L'absorbance mesurée permet de remonter à la contribution en unité GlcNAc dans le polymère et donc à la quantité de fonctions désacétylées disponibles.

ANNEXE 2

- Détermination de la masse molaire des chitosans par Viscosimétrie capillaire -

Afin de déterminer la masse viscosimétrique des deux chitosans utilisés dans cette étude, des mesures de viscosité ont été réalisées sur un appareil SCHOTT AVS 360. Dans les deux cas, les conditions opératoires et les paramètres de calcul déterminés par Rinaudo *et al.*²²³ ont été suivis. Le diamètre du capillaire est de 53 mm et toutes les expérimentations ont été réalisées à température ambiante.

Dans un premier temps, une solution mère de chitosan, de concentration massique C_1 (1 % pour le chitosan de bas poids moléculaire, 0,1% pour le moyen) est préparée par solubilisation dans un solvant composé d'acide acétique et d'acétate de sodium (0,3 M et 0,2 M respectivement). Par dilution successive de cette solution mère, des solutions de concentrations $C_2 = C/2$, $C_3 = 2C/5$, $C_4 = C/3$ et $C_5 = 2C/7$ sont préparées. Pour chaque solution, 4 points de mesure du temps d'écoulement sont réalisés. Afin d'obtenir un encadrement de la masse viscosimétrique, les valeurs inférieures et supérieures sont retenues pour la suite des calculs.

Les courbes d'équations $\frac{t-t_1}{t_1.C_i}$ et $\frac{1}{C_i} \ln\left(\frac{t_i}{t_0}\right)$ sont ensuite tracées. On obtient dans chacun des cas, deux droites linéaires d'équations :

$$y_1 = a.x_1 + b \text{ et } y_2 = c.x_2 + d$$

La viscosité en cm^3/g est ensuite obtenue par l'équation suivante : $[\eta] = \frac{y_1 + y_2}{2}$

Puis, la relation de Mark-Houwink donne la masse viscosimétrique des polymères suivant l'équation :

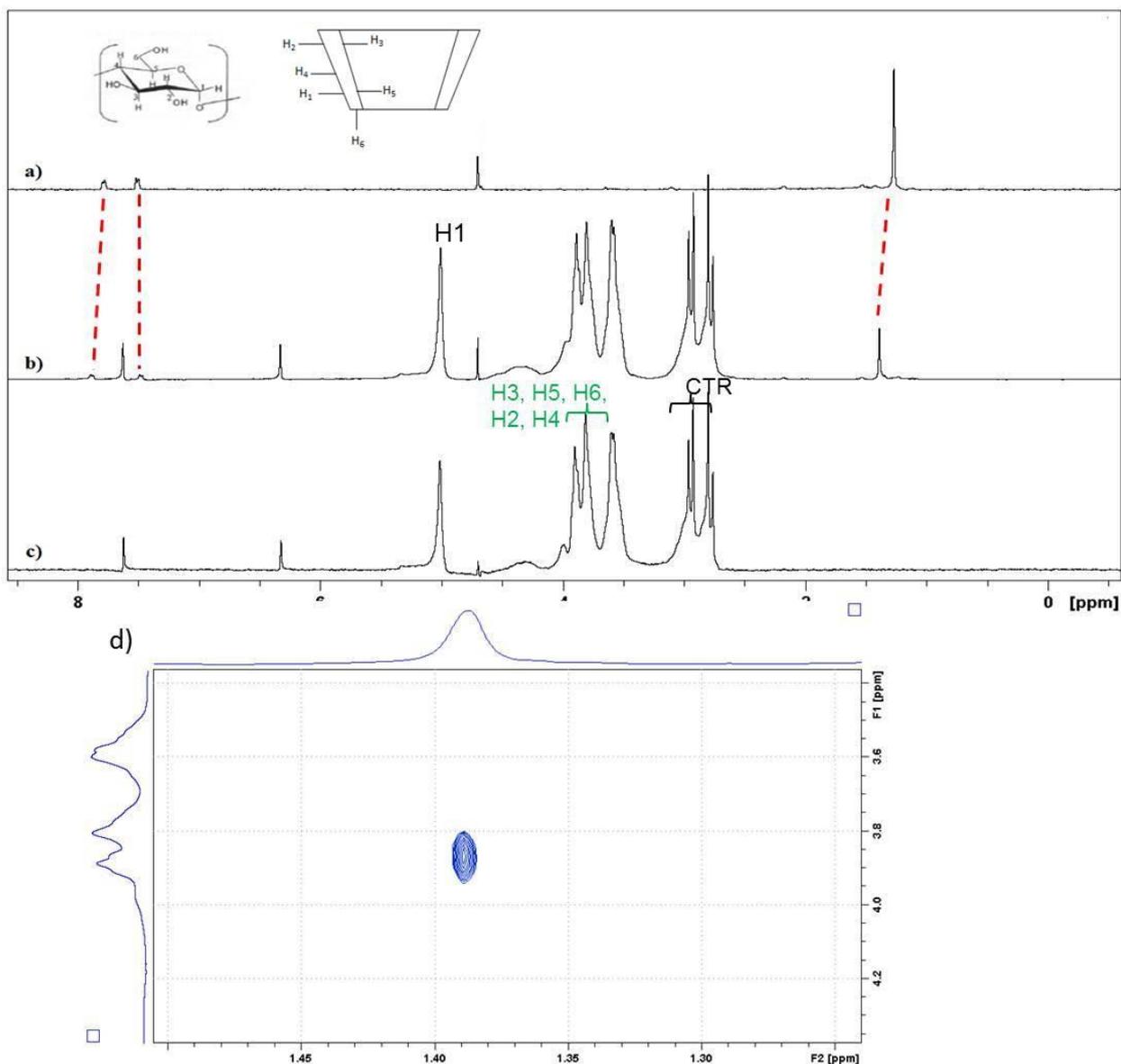
$M_v = \sqrt{\frac{[\eta]}{K}}$ où α et K sont les paramètres prédéterminés par Rinaudo *et al.*²²³ pour des chitosans de degré d'acétylation de 21 % et dans les conditions opératoires précédemment décrites ($\alpha = 0,76$ et $K = 74.10^{-5} \text{ dL/g}$).

Afin de vérifier la validité de ces résultats, le k' est calculé selon l'équation : $k'. [\eta]^2 = \alpha$. Cette valeur doit être la plus proche possible de 0,5 afin de confirmer les résultats.

ANNEXE 3

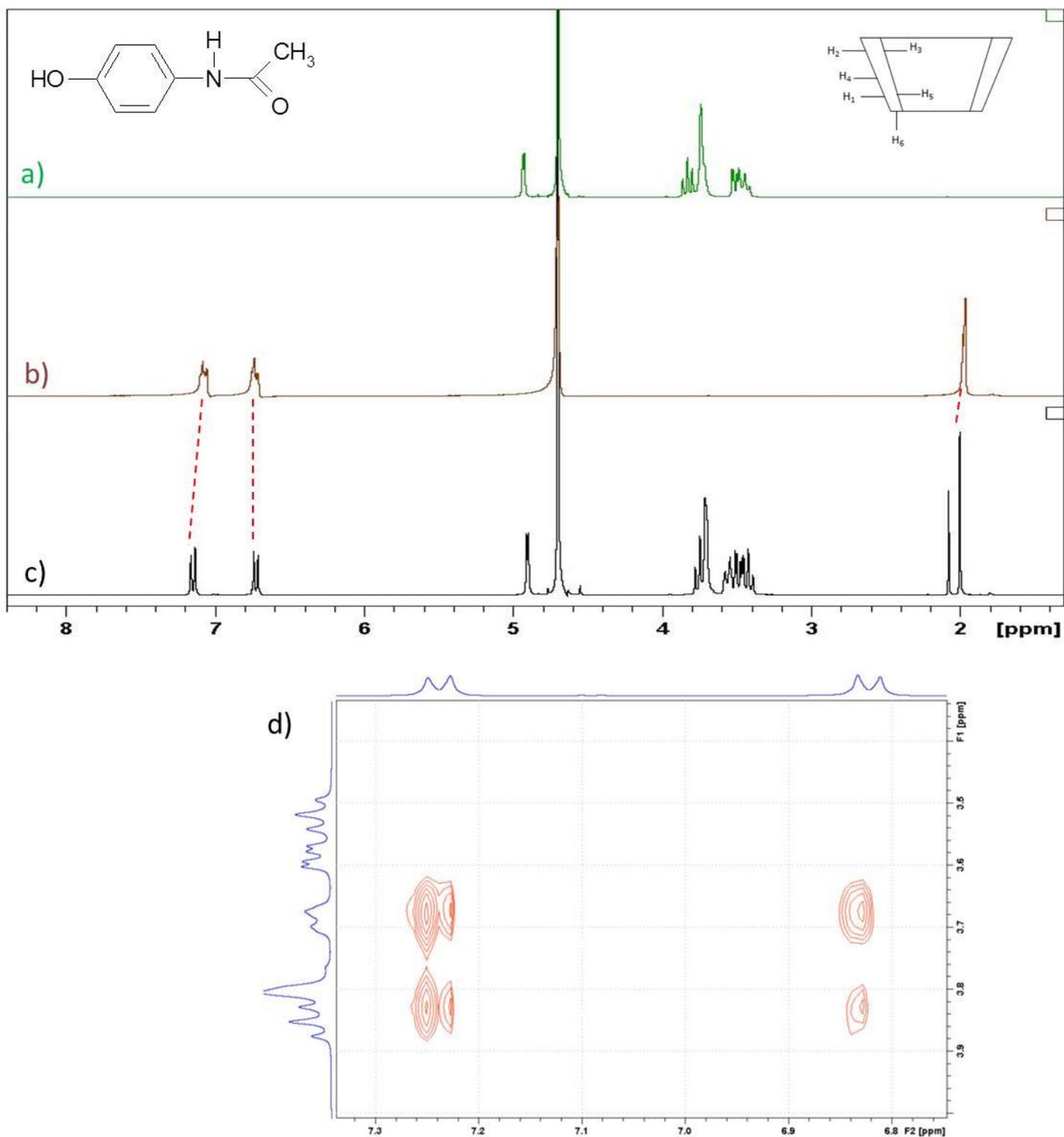
Complexation entre polyCTR- β CD et les molécules modèles
- Spectres RMN -

1. TBBA



Spectre ^1H du proton dans D_2O de : a) TBBA seul, b) Complexe polyCTR- β CD / TBBA, c) polyCTR- β CD seul, d) spectre NOESY 2D

2. Paracétamol

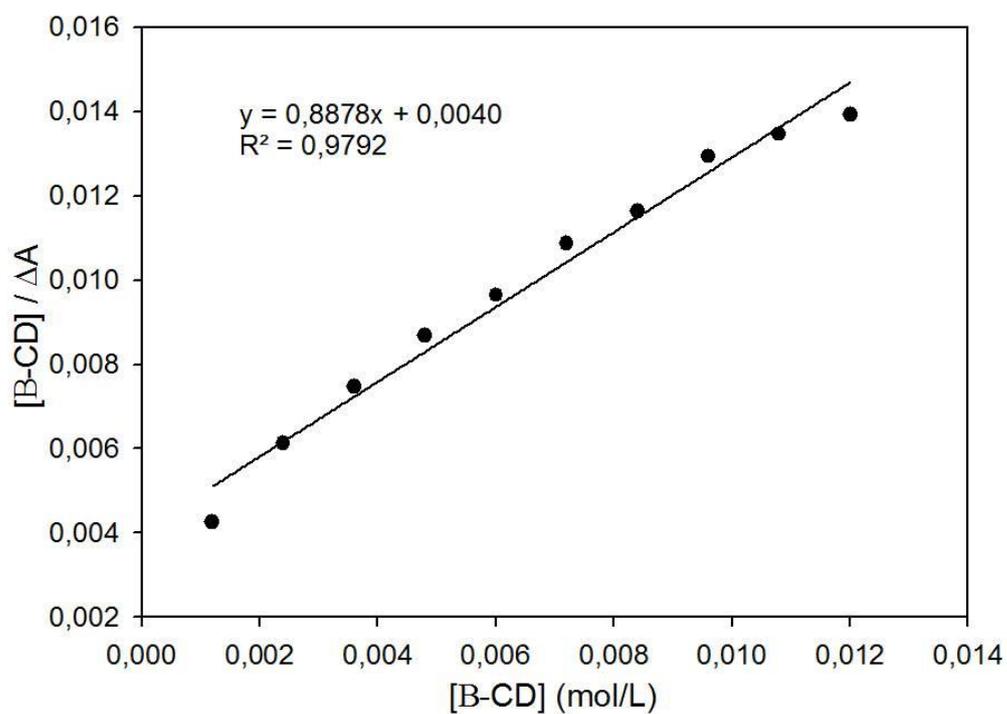
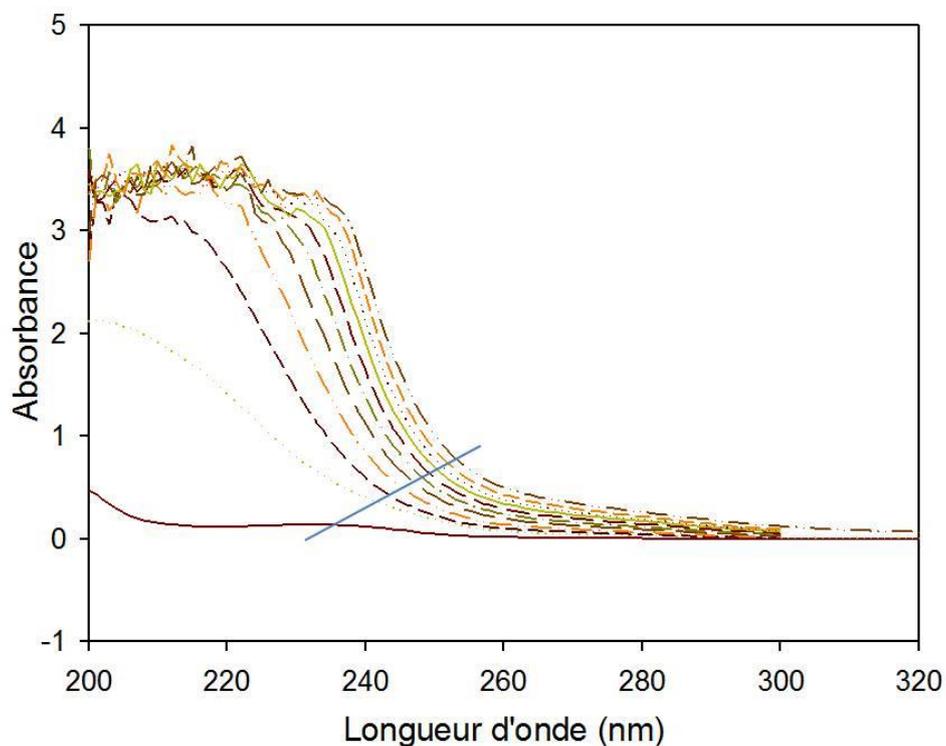


Spectre ^1H du proton dans D_2O de : a) polyCTR- β CD seul, b) P seul, c) Complexe polyCTR- β CD / TBBA, d) spectre NOESY 2D

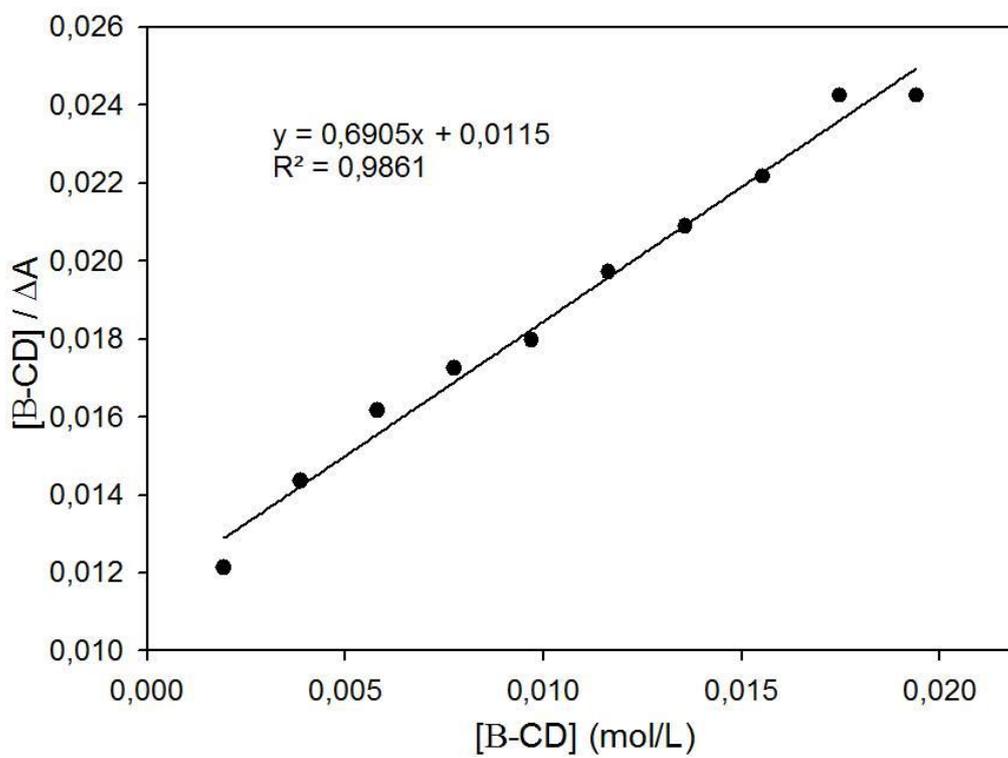
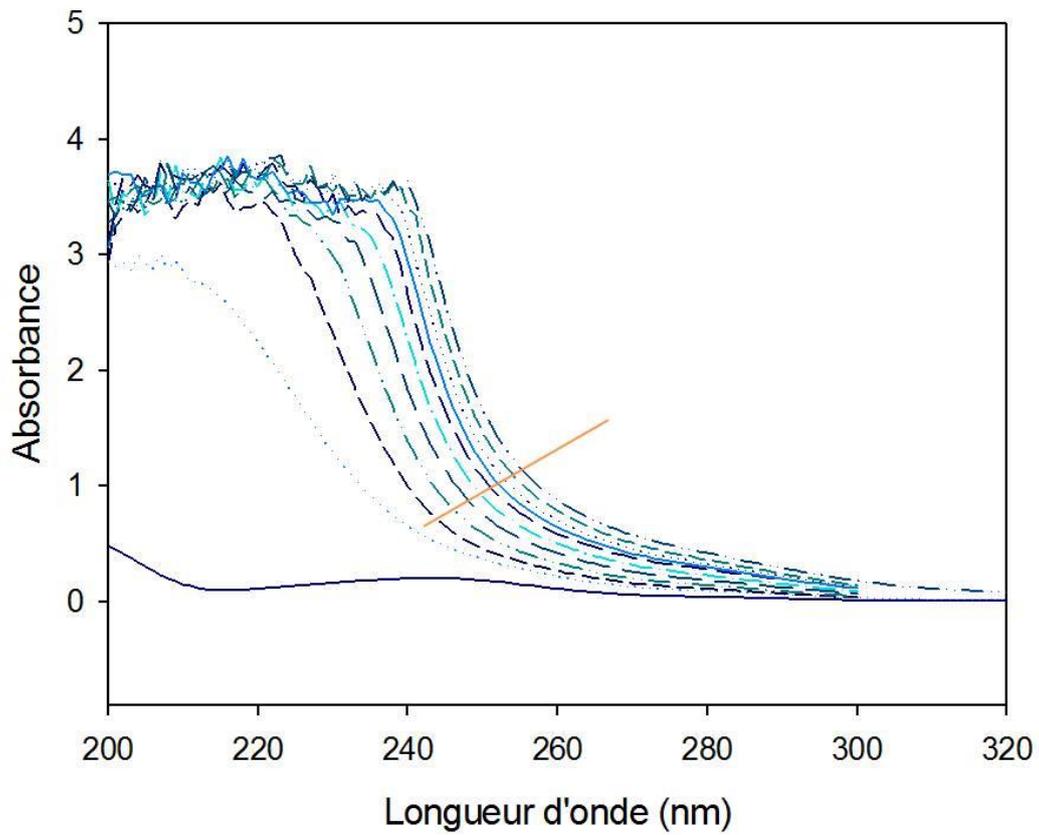
ANNEXE 4

Complexation entre polyCTR- β CD et les molécules modèles
- Par UV -

1. TBBA



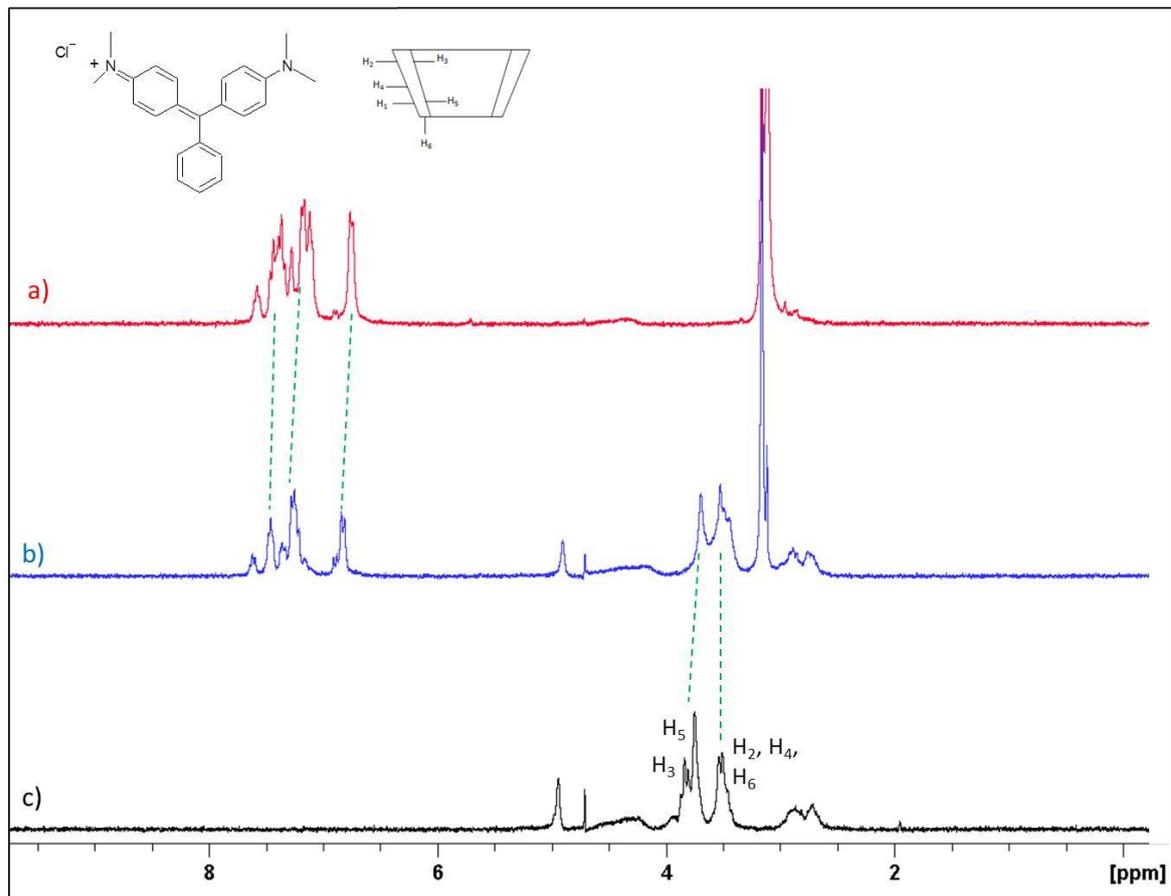
2. Paracétamol



ANNEXE 5

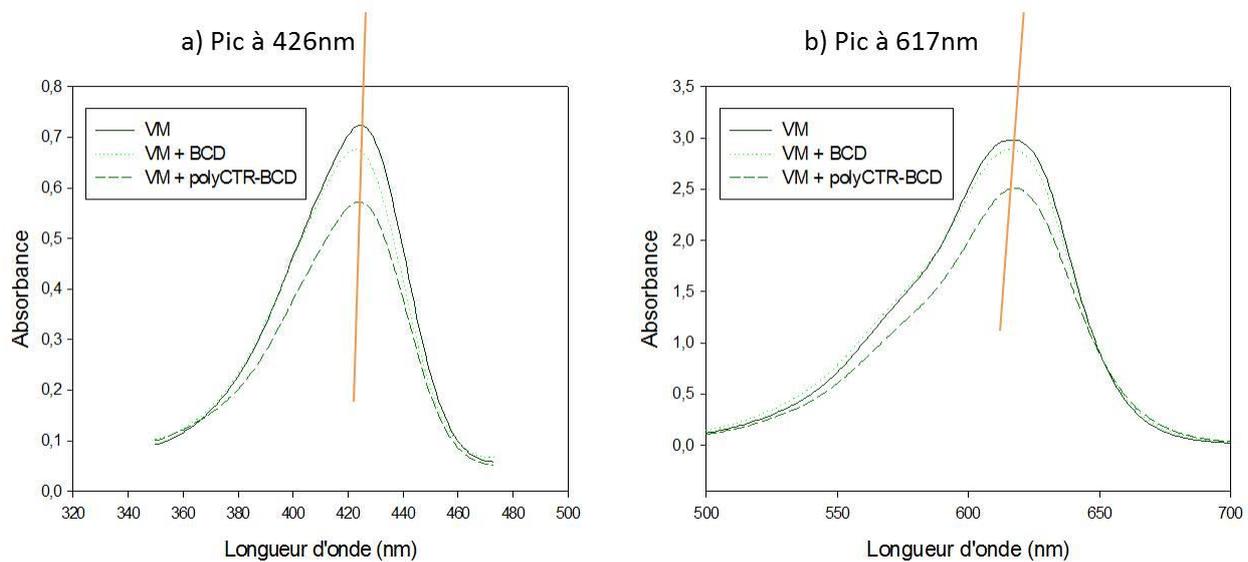
Complexation entre polyCTR- β CD et VM
- Par UV et RMN -

1. RMN



Spectre ^1H du proton de : a) VM seul, b) Complexe polyCTR- β CD / TBBA, c) polyCTR- β CD seul

2. UV



RÉSUMÉ

Les textiles sont utilisés dans de nombreux dispositifs médicaux extra et intra corporels (pansements, prothèses vasculaires, etc...). La recherche vise à leur apporter des propriétés thérapeutiques (antibactérienne, cicatrisante, régénérative). Parmi les solutions développées on peut transformer le dispositif en un réservoir libérant des substances actives. Le défi est de modifier le support chimiquement inerte selon des procédés non agressifs qui permettent l'incorporation de quantités suffisantes de la molécule active pour constituer une dose thérapeutique efficace dont la libération couvrira la période de cicatrisation. Le travail présenté dans cette thèse décrit une évolution du concept précédemment élaboré par le Laboratoire UMET, basé sur le greffage de cyclodextrines sur des biomatériaux variés pour la libération prolongée de médicaments. Il s'agit de l'application de la technique layer-by-layer (LbL) consistant à élaborer un assemblage multicouche - sur un support textile (PET) par superposition alternée de deux polyélectrolytes de charges opposées, pour former un enrobage des fibres par un film multicouche qui permettra au dispositif libérer un principe actif de manière prolongée. Notre système multicouche est basé sur un polymère anionique de β -cyclodextrine, alternant avec le chitosan (polymère cationique). L'optimisation de la construction LbL du film multicouche a été étudiée en parallèle par spectroscopie optique par guide d'onde (OWLS) et sur le textile ; sa dégradation et la libération de molécules modèles de principes actifs ont été suivies dans différents milieux, et les propriétés biologiques et microbiologiques ont été étudiées.

Mots clés : Biomatériau, chitosan, cyclodextrine, libération prolongée, textile, film multicouche, Spectroscopie optique par guide d'onde

ABSTRACT

Textiles are widely used in medical devices which are implantable or not (wound dressing, vascular prosthesis etc...) and researches currently aim to bring them therapeutic properties (antibacterial, healing, regenerative). Among the most efficient solutions, transforming the device into a drug delivery system capable of releasing some drugs or bioactive substances is investigated. The main challenges are firstly to chemically modify such inert materials with soft methods in order to keep their original properties, and secondly to adsorb a sufficient therapeutic dose of the drug that should then be released covering the critical healing period. The concept developed by the UMET laboratory consists of grafting cyclodextrins on several biomaterials for extended drug release. This work presents an evolution of this latter concept thanks to the Layer-by-Layer process. Multilayer assemblies are built on a textile support thanks to alternative adsorptions of polyelectrolytes with opposite charges. It forms a multilayer coating on the fibers which allows the extended release of active molecules. Our multilayer system is based on an anionic polymer of β -cyclodextrin and chitosan (cationic polymer). Multilayer building optimization following the LbL process was simultaneously studied with Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy (OWLS) and on textile. Its degradation and release of actives model molecules were followed in different media and biological and microbiological properties were studied.

Keywords : Biomaterial, chitosan, cyclodextrin, extended release, textile, multilayer, Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy