



HAL
open science

Fonctionnalisation et caractérisation multi-échelle de films minces de chitosane : vers une utilisation en ingénierie tissulaire

Hongyuan Zhang

► **To cite this version:**

Hongyuan Zhang. Fonctionnalisation et caractérisation multi-échelle de films minces de chitosane : vers une utilisation en ingénierie tissulaire. Autre. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0366 . tel-01752155

HAL Id: tel-01752155

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752155>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THÈSE

Présentée pour l'obtention du titre de :

DOCTEUR de L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Spécialité: Chimie et Physico-chimie des matériaux

Par :

Hongyuan Zhang

Fonctionnalisation et caractérisation multi-échelle de films minces de chitosane : vers une utilisation en ingénierie tissulaire

Soutenance publique à Nancy le 16 Décembre 2014 à Nancy

Membres du jury :

M. João F. Mano	Professeur, Université de Minho	Rapporteur
M. Hugues Brisset	Professeur, Université de Toulon	Rapporteur
M. Benoît Frisch	Directeur de recherche au CNRS, Université de Strasbourg	Examineur
M. Philippe Laval	Directeur de recherche de l'INSERM, Université de Strasbourg	Examineur
M. Patrick Menu	Professeur, Université de Lorraine	Examineur
Mme Elmira Arab-Tehrany	Maître de conférences (HDR), Université de Lorraine	Examinatrice
M. Franck Cleymand	Maître de conférences (HDR), Université de Lorraine	Directeur de thèse
M. Dahoun Abdesselam	Professeur, Université de Lorraine	Invité

*Institut Jean Lamour – UMR 7198- Département N2EV – Equipe 401
Parc de Saurupt - CS 50840- 54011 NANCY Cedex*

Université de Lorraine – Pôle M4 : matière, matériaux, métallurgie, mécanique

学如逆水行舟，不进则退。

*Les études sont comme un voilier à contre-courant,
soit vous allez de l'avant soit vous restez en arrière.*

梁启超

Liang Qichao

三人行，必有吾师焉，择其善者而从之，其不善者而改之。

*Quand on se promène ne serait-ce qu'à trois, chacun est certain de trouver en l'autre un
maître, faisant la part du bon pour l'imiter et du mauvais pour le corriger en soi-même.*

孔子

Confucius

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier M. João F. Mano, le professeur de l'Université de Minho et M. Hugues Brisset, le professeur de l'Université de Toulon pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail de thèse, ainsi que M. Benoît Frisch, le directeur de recherches au CNRS, M. Philippe Laval, le directeur de recherches à l'INSERM de l'Université de Strasbourg, M. Patrick Menu, le professeur, et Mme Elmira Arab-Teharany, la maîtresse de conférences de l'Université de Lorraine pour avoir accepté de participer au jury.

Ici, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Mme Elmira Arab-Teharany, qui m'a accompagnée tout au long de ce parcours, pour sa patience, son soutien constant et sa disponibilité. Ses conseils scientifiques m'ont permis d'obtenir rapidement l'autonomie nécessaire à un avancement efficace des travaux.

Un travail de recherche ne se fait jamais seul, et surtout dans le domaine des biomatériaux, une science multidisciplinaire qui nécessite une collaboration entre personnes aux savoirs et aux parcours différents. Ce travail a été réalisé essentiellement à l'Institut Jean Lamour et au Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio, Vandœuvre-lès-Nancy, France). Une étude préliminaire de biocompatibilité de matériaux nouveaux a été réalisée au laboratoire de Physiopathologie, Pharmacologie et Ingénierie Articulaires (PPIA, Biopôle de l'Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France). Je remercie donc tous les membres de ces trois laboratoires qui par leur disponibilité, leur savoir et leur implication, ont permis que je me sente bien dans mon travail. Je tiens à remercier le professeur Eric Gaffet, directeur de l'Institut Jean Lamour, le professeur Michel Linder, directeur du LIBio, et également le professeur Patrick Menu, directeur du PPIA, pour leur accueil, ainsi que Mesdames Christine Schwartz, Valérie Tamburini et Martine Tailleur pour leur gentillesse et leur efficacité dans la gestion de mon travail.

Je remercie particulièrement mon directeur de thèse, le docteur Franck Cleymand, qui a su m'aider et me soutenir tout au long de mon travail. Je le remercie pour ses conseils et la liberté qu'il m'a accordée.

Un grand merci à mesdames et messieurs Cyril Kahn, Gérard Henrion, Jean-François Pierson, Emilie Velot, André Mézin, Abdelkrim Redjaimia, Thierry Belmonte, Solenne

Fleutot, Halima Alem-Marchand, Marc Ponçot, Isabelle Royaux, Abdeslam Dahoun, Xiong Wang, Didier Rouxel, Thomas Gries, Olivier Ferry, François Montaigne, David Horwat pour leurs conseils scientifiques et leur amitié, et spécialement aux docteurs Jaafar Ghanbaja et Pascal Boulet, pour leur disponibilité et leur patience.

Merci aussi à Olivier Godard, Cédric Noël, Justine Paoli, Jérôme Chevrier, Erwan Etienne, Régis Peignier, Lionel Aranda, Jérôme Eugène, Béranger Boreux, Sylvie Migot-Choux, Christine Gendarme, Marie-Cécile De Weerd, Gwendal Le Bars, Pierre Schmitt, Patrice Poirot, Jacques Paties, Cyrille Borde, et Andréa Succu, pour leurs supports techniques, et spécialement à Francis Kosior et Patricio Francisco, qui jamais n'ont dit « non » à toutes mes demandes concernant l'informatique.

J'ai également eu la chance de développer dans l'équipe et les laboratoires de réelles amitiés. Dans le désordre, merci à Manuel, Martin, Alexandre, Alexis, Elodie, Quentin, Hugo, Éric, Amine, Anne-Sophie, Pascale, Marion, David, Laurent, Vincent, Simon, Magamou, Mélissa, Charlotte, Carole, Raza, Ghazi, Nadia, Maryam, Mouhamoud, Wafa, Rana, Thibault, Monique, Brigitte, Jacqueline, Gabriel, Reine, Lina, Yueying, Pan, Yingying, et Zhe. Une pensée spéciale pour Nolwenn, Irina, Ahmad, William, compagnons de travail de la nuit, et particulièrement pour Yong, Aurore, Van-Son, Alan, Adrien, et Peng, Qi, Khaoula, Martin. Merci pour votre disponibilité et vos conseils scientifiques. Le « Goûter du Jeudi » et tous les sorties font partie de mes joyeux souvenirs.

Je tiens tout particulièrement à remercier le docteur Chinh Nguyen-trung, qui n'a cessé jusqu'à ce jour de me faire bénéficier de son aide et de ses précieux conseils.

Mes pensées les plus affectueuses vont pour mes parents, pour leur soutien illimité durant ces longues années de mon parcours universitaire. Enfin, un grand merci à Weifeng,, mon mari, qui a su me reconforter et me motiver dans les moments difficiles, et qui m'a apporté un soutien sans bornes au cours de toutes ces années.

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	9
ABBREVIATIONS	15
TABLES.....	19
FIGURES.....	23
INTRODUCTION GÉNÉRALE	27
CHAPITRE I. CONCEPTION ET FONCTIONNALISATION DE FILMS MINCES ISSUS D'AGRO-RESSOURCE POUR DES APPLICATIONS EN INGÉNIERIE TISSULAIRE (ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE).....	33
1.1. INGENIERIE TISSULAIRE	35
1.2. CONCEPTION DE MATRICE EXTRACELLULAIRE DE CULTURE (MEC)	35
1.3. CHOIX DU MATERIAU DE BASE POUR L'ELABORATION DE MEC.....	36
1.4. FONCTIONNALISATION D'UN BIOMATERIAU EN VOLUME ET/OU EN SURFACE.....	41
1.4.1. Fonctionnalisation en volume par incorporation de biomolécules molles.....	41
1.4.2. Fonctionnalisation de la surface par des traitements plasma.....	44
CHAPITRE II . ÉLABORATION ET CARACTÉRISATION DES NANOLIPOSOMES, DES SOLUTIONS/FILMS DE CHITOSANE ET DE CHITOSANE MÉLANGÉ AUX NANOLIPOSOMES (MÉTHODE ET MATÉRIAUX).....	47
2.1. ÉLABORATION ET CARACTERISATION DES NANOLIPOSOMES.....	50
2.1.1. Élaboration des nanoliposomes	50
2.1.2. Caractérisation des nanoliposomes	50
2.2. PREPARATION ET CARACTERISATION DES SOLUTIONS/FILMS DE CHITOSANE ET DE CHITOSANE MELANGE AUX NANOLIPOSOMES A BASE DE LECITHINE DE SOJA, DE COLZA ET DE SAUMON.....	55
2.2.1. Élaboration des solutions/films	55
2.2.2. Caractérisation physico-chimique des films de chitosane et de chitosane mélangé aux nanoliposomes à base de lécithine de soja, de colza ou de saumon.....	55
2.3. DETERMINATION DES PROPRIETES BIOLOGIQUE DES FILMS DE CHITOSANE SEUL ET DE CHITOSANE MELANGE AUX NANOLIPOSOMES.....	66
2.3.1. Biocompatibilité <i>in vitro</i>	66
2.3.2. Biodégradabilité <i>in vitro</i>	70
2.4. TRAITEMENT PLASMA FROID.....	71
2.4.1. Dispositif expérimental.....	71
2.4.2. Optimisation des paramètres physico-chimiques du traitement plasma.....	72
CHAPITRE III. INFLUENCE DE L'INCORPORATION DES NANOLIPOSOMES SUR LES PROPRIÉTÉS DES FILMS DE CHITOSANE	77
3.1. DETERMINATION DE CERTAINES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES NANOLIPOSOMES.....	79

3.1.1. Indentification des acides gras dans les différentes lécithines	79
3.1.2. Classification des lipides.....	82
3.1.3. Forme et taille géométrique des nanoliposomes.....	83
3.1.4. Mobilité électrophorétique et potentiel zêta des nanoliposomes	85
3.1.5. Tension superficielle des solutions de nanoliposomes.....	86
3.2. TENSION SUPERFICIELLE DE SOLUTION DE CHITOSANE SEUL ET DE CHITOSANE MELANGE AUX NANOLIPOSOMES	88
3.3. DETERMINATION DE CERTAINES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES FILMS	88
3.3.1. Couleur et épaisseur.....	88
3.3.2. Taux de cristallinité	90
3.3.3. Identification des groupements chimiques par FTIR-ATR et XPS	91
3.3.4. Mouillabilité et énergie de surface.....	96
3.3.5. Propriétés viscoélastiques et températures de relaxation	97
3.3.6. Morphologies, topologies & propriétés mécaniques	100
CONCLUSION	104
CHAPITRE IV. FONCTIONNALISATION DE LA SURFACE À L'AIDE DU TRAITEMENT PLASMA	105
4.1. OPTIMISATION DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES A L'AIDE D'UN PLAN D'EXPERIENCES	107
4.1.1. Optimisation des conditions expérimentales du traitement plasma.....	109
4.1.2. Validité du plan d'expériences : l'influence du rapport N₂/H₂ sur la mouillabilité de la surface des films	109
4.1.3. Limite d'utilisation : son caractère transitoire	112
4.2. INFLUENCE DU RAPPORT VOLUMIQUE N ₂ /H ₂ SUR : PERTE DE MASSE, COMPOSITION CHIMIQUE DE SURFACE (ANALYSE PAR XPS), MORPHOLOGIE, ET TOPOLOGIE DE SURFACE (ANALYSE PAR IC-AFM)	114
4.2.1. Perte de masse	114
4.2.2. Détermination des groupements chimiques par XPS	115
4.2.3. Topologie et mesure de la rugosité par IC-AFM	120
4.2.4. Discussion et interprétation	123
CONCLUSION	125
CHAPITRE V. ÉVALUATION DE LA BIOCOPATIBILITÉ ET DE LA BIODÉGRABILITÉ <i>IN</i> <i>VITRO</i> DES FILMS DE CHITOSANE SEUL ET DE CHITOSANE MÉLANGÉ AUX NANOLIPOSOMES	127
5.1. ÉVALUATION DE LA BIOCOPATIBILITE <i>IN VITRO</i>	129
5.1.1. Capacité d'absorption d'eau et vitesse de gonflement des films	129
5.1.2. Faible cytotoxicité après 24 h d'ensemencement des cellules sur MEC.....	130
5.1.3. Comportement de CSMh en contact avec des MEC.....	131
5.1.4. Evaluation de l'activité métabolique des CSMh pentant 21 jours	135

5.1.5. Interactions entre les cellules et la matrice de support	136
5.2. ÉVALUATION DE LA BIODEGRADABILITE <i>IN VITRO</i>	139
5.2.1. Mécanisme de biodégradabilité par lysozyme d'un polymère à base de chitosane.....	139
5.2.2. Biodégradation en volume et/ou en surface.....	139
5.2.3. Mouillabilité et degré de déacétylation (DD) durant la biodégradation.....	144
CONCLUSION	150
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	151
ANNEXE.....	155
RÉFÉRENCE BIBLIOPGRAPHIQUE	165

ABBREVIATIONS

AFM	Microscopie à force atomique
AGPI	Acide gras polyinsaturés
ASB	Albumine de sérum bovin
DA	Degré d'acétylation
DD	Degré de déacétylation
DHA	Acide docosahexaénoïque
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DMTA	Dynamic mechanical thermal analysis
DRX	Diffraction des rayons X
EPA	Acide éicosapentaénoïque
FTIR-ATR	Fourier transform infrared spectroscopy-Attenuated total reflection
GC	Gas chromatography
LDH	Lactate Déshydrogénase
MEC	Matrice extracellulaire de culture
MET	Microscopie électronique transmission
MTT	Sel de tétrazolium, bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
PBS	Phosphate buffered saline/tampon phosphate salin
PC	Phosphatidylcholine
PET	Polytéréphtalate d'éthylène
PGA	Polyglycolic acid
PHA	Polyhydroxy alkanoates
PHB	Polyhydroxy-butyrates
PHBV	Poly hydroxybutyrates co hydroxyvalerate
PI	Phosphatidylinositol

PLA	Poly (acide lactique)
PS	Phosphatidylsérine
RSM	Response surface methodology
SVF	Sérum de veau foetal
TAG	Triglycérides
T _g	Température de transition vitreuse
u.a.	Unité arbitraire

TABLES

TABLEAU I- 1 : APPLICATIONS INDUSTRIELLES DE LA CHITINE ET DU CHITOSANE DANS LE DOMAINE BIOMEDICAL ET PHARMACEUTIQUE (CRINI <i>ET AL.</i> , 2009).	40
TABLEAU II- 1 : REFERENCES SELECTIONNES POUR LES PRINCIPES DES TECHNIQUES UTILISES POUR LA CARACTERISATION DES NANOLIPOSOMES, DES SOLUTIONS/FILMS DE CHITOSANE ET DE CHITOSANE MELANGE AUX NANOLIPOSOMES DE SOJA, DE COLZA ET DE SAUMON.	49
TABLEAU II- 2 : LA COMPOSANTE POLAIRE, DISPERSIVE ET L'ENERGIE DE SURFACE TOTALE DE L'EAU (RESISTIVITE = 18,2 M Ω ·CM) ET DE DIODOMETHANE.....	61
TABLEAU II- 3 : DOMAINE EXPERIMENTAL ET NIVEAU DES FACTEURS.....	73
TABLEAU II- 4 : ARRANGEMENT DES 25 EXPERIENCES SUR LES FILMS DE CHITOSANE UTILISANT LES RESEAUX DE DOEHLERT ET L'ANGLE DE CONTACT MESURE APRES TRAITEMENT.....	74
TABLEAU III- 1 : LISTE DES PRINCIPALES COMPOSITIONS CHIMIQUES ET LA TENEUR EN MASSE (% EN MASSE) DES ACIDES GRAS DES LECITHINES DE SOJA, DE COLZA ET DE SAUMON.	80
TABLEAU III- 2 : PROPORTIONS EN MASSE DE DIFFERENTES CLASSES DE PHOSPHOLIPIDES CONTENUES DANS LES LECITHINES.	83
TABLEAU III- 3 : LISTE DES VALEURS DE LA TAILLE ET DE L'INDICE DE POLYDISPERSITE DES NANOLIPOSOMES DETERMINEES PAR L'APPAREIL ZETASIZER.....	83
TABLEAU III- 4 : POTENTIEL ZETA ET LA MOBILITE ELECTROPHORETIQUE DES NANOLIPOSOMES.	85
TABLEAU III- 5 : VALEURS DE LA TENSION SUPERFICIELLE DES TROIS TYPES DE LECITHINES (SOJA, COLZA, SAUMON).....	86
TABLEAU III- 6 : TENSION SUPERFICIELLE DES SOLUTIONS DE CHITOSANE ET DE CHITOSANE MELANGE AUX DIFFERENTS NANOLIPOSOMES.	88
TABLEAU III- 7 : L*, A*, ET B* DES FILMS DE CHITOSANE SEUL ET DE CHITOSANE MELANGE AUX NANOLIPOSOMES.	89
TABLEAU III- 8 : EPAISSEUR DE FILMS DE CHITOSANE SEUL ET DE CHITOSANE MELANGES AUX NANOLIPOSOMES.	89
TABLEAU III- 9 : TAUX DE CRISTALLINITE DES FILMS DE CHITOSANE SEUL ET DE CHITOSANE MELANGE AUX NANOLIPOSOMES.	91
TABLEAU III- 10 : GROUPES ACTIFS EN INFRA ROUGE DANS LES FILMS MINCES DE CHITOSANE ET DE CHITOSANE MELANGE AUX NANOLIPOSOMES.	94
TABLEAU III- 11 : DD ESTIME EN UTILISANT LA FORMULE DE DOMARD AND RINAUDO, (1983) (FORMULE II-12), DE BRUGNEROTTO <i>ET AL.</i> (2001) (FORMULE II-13), ET DE MIYA <i>ET AL.</i> , (1980) (FORMULE II-14).....	95
TABLEAU III- 12 : TABLE DE COMPOSITION XPS DES FILMS DE CHITOSANE ET DE MELANGE AVEC DES NANOLIPOSOMES.	96

TABLEAU III- 13 : MOYENNES D'ENERGIE DE SURFACE, DE COMPOSANTE POLAIRE ET DISPERSIVE SUR LES FILMS MINCES DE CHITOSANE ET DE CHITOSANE MELANGES AUX NANOLIPOSOMES.	97
TABLEAU III- 14 : TEMPERATURES DE RELAXATIONS (T_{α} ET T_{β}) DU CHITOSANE ET DES FILMS CHITOSANE/NANOLIPOSOMES A 10Hz ET MODULE DE YOUNG DES FILMS DE CHITOSANE ET CHITOSANE MELANGE AUX NANOLIPOSOMES A TROIS TEMPERATURES (-18 ° C, 25 ° C ET 37 ° C).....	99
TABLEAU III- 15 : R_A , R_Q , S_K , ET E_K DES FILMS DE CHITOSANE ET DE CHITOSANE MELANGE AUX DIFFERENTS NANOLIPOSOMES.	101
TABLEAU IV- 1 : ANALYSE DES VARIANCES POUR ANALYSER LA DIFFERENCE SIGNIFICATIVE DES ANGLES DE CONTACT MESURES.	107
TABLEAU IV- 2 : COEFFICIENTS DE REGRESSION DU SECOND ORDRE EN UTILISANT LES EQUATIONS POLYNOMIALES QUADRATIQUES QUI ONT OBTENUES PAR METHODE DES SURFACES DE REPONSES.	108
TABLEAU IV- 3 : ANGLE DE CONTACT DES FILMS AVANT ET APRES LE TRAITEMENT PLASMA.	110
TABLEAU IV- 4 : ENERGIES DE SURFACE AVANT ET APRES TRAITEMENT PLASMA POUR LES FILMS DE CHITOSANE ET LES FILMS DE CHITOSANE MELANGE AUX NANOLIPOSOMES.....	111
TABLEAU IV- 5 : VARIATION DE MASSE EN MASSE % AVANT ET APRES LE TRAITEMENT PLASMA.	114
TABLEAU IV- 6 : (A) TABLE DE COMPOSITION XPS DES FILMS DE CHITOSANE SEUL ; (B) DECONVOLUTION DU PIC C1S APRES LE TRAITEMENT PLASMA PAR DIFFERENT RAPPORT DE N_2/H_2	119
TABLEAU IV- 7 : (A) TABLE DE COMPOSITION XPS DES FILMS DE CHITOSANE+NANOLIPOSOMES DE SOJA, DE COLZA ET DE SAUMON APRES LE TRAITEMENT PLASMA PAR DIFFERENT RAPPORT DE N_2/H_2 ; (B) DECONVOLUTION DU PIC C1S, (C) DECONVOLUTION DU PIC O1S.....	119
TABLEAU IV- 8 : DECONVOLUTION DU PIC N1S POUR FILMS DE CHITOSANE SEUL ET CHITOSANE MELANGE AUX NANOLIPOSOMES APRES TRAITEMENT PLASMA AU DIFFERENT RAPPORT DE N_2/H_2	120
TABLEAU IV- 9 : R_A , R_Q , S_K , ET E_K DES FILMS DE CHITOSANE ET DE CHITOSANE MELANGE AUX DIFFERENTS NANOLIPOSOMES.	123
TABLEAU V- 1 : DESCRIPTION DE MORPHOLOGIES ET LA DENSITE DES CELLULES SUR CHAQUE FILM MINCE.	133
TABLEAU V- 2 : ANOVA UN FACTEUR APPLIQUE DANS LE CAS DU FILM DE CHITOSANE SEUL INCUBE DANS LA SOLUTION PBS+10 MG/L LYSOZYME PENDANT 28 JOURS.....	145
TABLEAU V- 3 : COMPARAISON MULTIPLE DANS LE CAS DU FILM DE CHITOSANE SEUL INCUBE DANS LA SOLUTION PBS+10 MG/L LYSOZYME PENDANT 28 JOURS.....	145
TABLEAU V- 4 : DD ESTIME DES FILMS DE CHITOSANE ET DE CHITOSANE + NANOLIPOSOMES DURANT 28 JOURS DANS LA SOLUTION PBS + 10 MG/L LYSOZYME EN UTILISANT LA FORMULE DE BRUGNEROTTO <i>ET AL.</i> (2001).	148

FIGURES

FIGURE I- 1 : REPRESENTATION DE LA STRUCTURE CHIMIQUE SEMI-DEVELOPPEE DE LA CHITINE ET DU CHITOSANE MONTRANT LE CARACTERE « CO-POLYMERIQUES » DES BIOMATERIAUX UTILISES.....	38
FIGURE I- 2 : MODELE MOLECULAIRE D'UN PHOSPHOLIPIDE.....	42
FIGURE I- 3 : LES GROUPES FONCTIONNELS CARBOXYLE (1) ET AMINE PRIMAIRE (2), AMINE SECONDAIRE (3), ET AMINE TERDIAIRE (4).	45
FIGURE II- 1 : MODELE COLORIMETRIQUE LA^*B^*	56
FIGURE II- 2 : ILLUSTRATION D'UNE EXTRACTION DE PROFIL DE SURFACE.....	58
FIGURE II- 3 : SIGNIFICATION DE R_A	59
FIGURE II- 4 : SIGNIFICATION DE $Sk(RSk)$ ET $Ku(RKu)$	60
FIGURE II- 5 : ILLUSTRATION DE LIGNE DE BASE DANS LE CAS DU FILM DE CHITOSANE SEUL, DEFINIE PAR LA METHODE DE BAXTER <i>ET AL.</i> (1991). A SIGNIFIE LES GROUPEMENTS AMIDE III (C-N, N-H). AMIDE I SIGNIFIE C=O, AMIDE II SIGNIFIE C-N ET N-H.....	63
FIGURE II- 6 : REDUCTION DU MTT EN UN PRECIPITE «FORMAZAN» VIOLET DANS L'EAU PAR NADH- DESHYDROGENASE.	69
FIGURE II- 7 : DISPOSITIF EXPERIMENTAL DU REACTEUR PLASMA MICRO-ONDES (HODY <i>ET AL.</i> , 2006).....	72
FIGURE III- 1 : STRUCTURE CHIMIQUE DE L'EPA ET DE LA DHA.	82
FIGURE III- 2 : EXEMPLE D'UNE IMAGE DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION DES NANOLIPOSOMES DE SAUMON EFFECTUEES AU CC-MEM DE L'IJL (BARRE ECHELLE = 200 NM).	84
FIGURE III- 3 : ÉVALUATION DE TAILLE DES NANOLIPOSOMES (A) ET DE TENSION SUPERFICIELLE (B) PENDANT 12 JOURS DE CONSERVATION A 4 °C.....	87
FIGURE III- 4 : FILMS DE CHITOSANE SEUL ET DE CHITOSANE MELANGE AUX NANOLIPOSOMES.	89
FIGURE III- 5 : SPECTRES DE DRX-GA DES FILMS.....	91
FIGURE III- 6 : SPECTRES FTIR-ATR DES FILMS DE CHITOSANE ET DES FILMS DE CHITOSANE MELANGE AUX NANOLIPOSOMES.	93
FIGURE III- 7 : MODULE DE CONSERVATION (A) ET FACTEUR DE PERTE $TAN \Delta$ (B) POUR LE CHITOSANE, POUR LES FILMS DE CHITOSANE MELANGE AUX NANOLIPOSOMES A LA FREQUENCE DE 10 HZ.	98
FIGURE III- 8 : TENSION SUPERFICIELLE EN FONCTION DE LA FORCE D'ADHERENCE POUR LE CHITOSANE MELANGE AUX NANOLIPOSOMES.	102
FIGURE III- 9 : IMAGES HAUTEUR, CARTOGRAPHIE DE MODULE D'YOUNG (MODELE DMT) ET IMAGE D'ADHESION REALISEES PAR TH-AFM SUR DES FILMS DE CHITOSANE SEUL (A), DE (B) CHITOSANE/ NANOLIPOSOMES DE SOJA, DE (C) CHITOSANE/NANOLIPOSOMES DE COLZA ET (D) CHITOSANE/ NANOLIPOSOMES DE SAUMON... ..	103

FIGURE IV- 1 : SUIVI DE L' ANGLE DE CONTACT DE FILM DE CHITOSANE SEUL AU COURS DU TEMPS DE CONSERVATION A 4 °C.	113
FIGURE IV- 2 : EXEMPLE DE DECONVOLUTION DE PIC DE FILM DU CHITOSANE SEUL.	116
FIGURE IV- 3 : IMAGES 3D AFM DES FILMS DE CHITOSANE NON TRAITE (A), TRAITE AVEC N ₂ /H ₂ =88/12 % (B), CHT+NSOJA NON TRAITE (C), TRAITE AVEC N ₂ /H ₂ =100/0 % (D), CHT+NCOLZA NON TRAITE (E), TRAITE AVEC N ₂ /H ₂ =88/12 % (F), CHT+NSAUMON NON TRAIT (G), ET TRAITE AVEC N ₂ /H ₂ =100/0 % (H). UNITE EN NM.	122
FIGURE V- 1 : A : ÉVALUATION DU POURCENTAGE DE GONFLEMENT DES FILMS DE CHITOSANE, ET DE CHITOSANE MELANGE A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE NANOLIPOSOMES DURANT 21 JOURS D' INCUBATION DANS PBS. B : EXEMPLE DU FILM DE CHT+NSAUMON 0,5 % AVANT (GAUCHE) ET APRES 24 H (DROITE) D' INCUBATION DANS PBS. * SIGNIFICATIF.	130
FIGURE V- 2 : MORPHOLOGIE DES CSMH ENSEMENCEES SUR LES FILMS DE CHITOSANE SEUL ET DE CHITOSANE MELANGE AUX NANOLIPOSOMES.	131
FIGURE V- 3 : EVALUATION DE QUANTITE D' ADN EN µG/ML DURANT 21 JOURS.	134
FIGURE V- 4 : NOMBRE DE CELLULES PAR ML DE MILIEU DE CULTURE ESTIME PAR LA QUANTITE D' ADN.	135
FIGURE V- 5 : ACTIVITE METABOLIQUE DES CSMH DURANT 21 JOURS DE CULTURE CELLULAIRE. UN SUPPORT PLASTIQUE CONSISTE EN UN SUPPORT CLASSIQUE POUR LA CULTURE CELLULAIRE. * SIGNIFICATIF.	135
FIGURE V- 6 : RAPPORT D' ACTIVITE METABOLIQUE SUR LA QUANTITE D' ADN PAR ML DE MILIEU DE CULTURE.	136
FIGURE V- 7 : ILLUSTRATION DE L' ATTAQUE DU CHITOSANE AU NIVEAU DE LA LIAISON B (1→4) PAR LYSOZYME.	139
FIGURE V- 8 : IMAGES MEB DES FILMS DE CHITOSANE SEUL AVANT ET APRES INCUBES DANS LA SOLUTION PBS CONTENANT 10 µG/ML LYSOZYME DURANT 28 JOURS.	140
FIGURE V- 9 : IMAGES MEB DES FILMS DE CHT CONTENANT DES NANOLIPOSOMES DE SOJA (A) ET (B) ; DE SAUMON (C) ET (D) INCUBE DANS LA SOLUTION PBS CONTENANT 10 µG/ML LYSOZYME PENDANT 21 JOURS.	141
FIGURE V- 10 : IMAGES MEB DES FILMS DE CHT CONTENANT DES NANOLIPOSOMES DE SOJA (A) ET (B) ; DE SAUMON (C) ET (D) INCUBE DANS LA SOLUTION PBS CONTENANT 10 MG/L LYSOZYME PENDANT 28 JOURS.	142
FIGURE V- 11 : VARIATION DE LA MASSE DES FILMS DE CHITOSANE, DE CHT+NSOJA, ET DE CHT+NSAUMON DANS LA SOLUTION PBS+10 µG/ML DURANT 28 JOURS.	143
FIGURE V- 12 : ANGLE DE CONTACT DE FILMS DE CHITOSANE, DE CHT+NSOJA ET DE CHT+NSAUMON PENDANT 28 JOURS D' INCUBATION.	144
FIGURE V- 13 : SPECTRES FTIR-ATR DES FILMS DE CHITOSANE (A) ET DES FILMS CHITOSANE/NANOLIPOSOMES DE SOJA (B) ET DE SAUMON (C) INCUBES DANS LA SOLUTION PBS+10 MG/L DE LYSOZYME PENDANT 28 JOURS.	147

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les progrès en médecine dépendent de plus en plus de la disponibilité de biomatériaux spécifiques qui permettent de contrôler avec précision le comportement de systèmes biologiques (Langer and Peppas, 2003). Avec une compréhension croissante des processus biologiques, le développement de nouvelles possibilités en science des matériaux et de nouvelles exigences en médecine, les biomatériaux¹ sont progressivement passés de bio-inertes à biodégradables et maintenant bioactifs (Hench and Thompson, 2010; Huebsch and Mooney, 2009).

Parmi les différents domaines des biotechnologies et de la bio-ingénierie, le domaine de la **médecine générative** est un secteur où l'innovation sur les biomatériaux et leurs mises en forme est au cœur des préoccupations scientifiques et technologiques. Ces biomatériaux peuvent être employés pour restaurer et/ou remplacer des cellules, des tissus ou des organes endommagés par un traumatisme soudain, une maladie ou des anomalies génétiques et pour permettre de retrouver leurs activités fonctionnelles (Langer and Vacanti, 1993; Naderi *et al.*, 2011). L'objectif final est, soit d'utiliser des tissus fabriqués *in vitro*, soit de permettre au corps de régénérer les tissus *in vivo*² (Lutolf and Hubbell, 2005).

Les biomatériaux utilisés en tant que matrice de support doivent assurer deux fonctions principales :

- 1) diriger l'organisation, la croissance et la différenciation des cellules, en apportant un support physique et des signaux chimiques et/ou
- 2) assurer un environnement idéal aux cellules sélectionnées.

1 La Société Européenne des Biomatériaux (ESB) a défini lors de la conférence de Chester (UK) en 1991, puis à l'occasion de celle de Sorrento (Italie) en 2005, un biomatériau comme « un matériau conçu pour interagir avec des systèmes biologiques, qu'il participe à la constitution d'un dispositif à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou d'assistance) fonctionnelle ».

2 le terme *in vivo* (en latin : « au sein du vivant ») qualifie des recherches ou des examens pratiqués sur un organisme vivant, par opposition à *in vitro* ou *ex vivo*.

Dans le premier cas, on parlera d'**ingénierie tissulaire** où le développement *in vitro* de substituts biologiques est l'axe principal de recherche et de développement. Dans le second cas, on parlera plutôt de **thérapie cellulaire** où la prévention et/ou le traitement des pathologies humaines par l'administration de cellules choisies, multipliées, traitées ou modifiées *ex vivo* est au cœur des préoccupations.

☞ Dans le cadre de cette thèse nous nous intéresserons uniquement au domaine de l'ingénierie tissulaire.

Il est à noter que dans les deux cas cités ci-dessus, la régénération est favorisée par l'utilisation de cellules *in vitro*, qui peuvent provenir de différentes sources (autologues¹; allogéniques², xénogéniques³) et être de différents types (cellules souches, cellules différenciées, ...). La prolifération et la différenciation cellulaires, sont donc nécessairement à étudier et contrôler. Dans les deux cas, c'est la compréhension fine des réponses mécaniques et biologiques des biomatériaux en fonction, d'une part de leurs propriétés physico-chimiques de surface, et d'autre part de leur architecture tridimensionnelle qui permettra de concevoir des matrices de support fonctionnelles. Il est clair que les aspects biomécaniques sont aussi nécessairement à prendre en compte tout comme l'étude des propriétés des tissus originaux, l'identification des propriétés minimales requises pour assurer la fonction, la caractérisation des signaux mécaniques régulant les tissus fabriqués ou l'efficacité et la sécurité des tissus fabriqués.

☞ Dans cette thèse, nous nous focaliserons sur la modification des propriétés physico-chimique de films minces pour des applications en ingénierie tissulaire et leur impact sur leurs biocompatibilités.

¹ Provenant du patient lui-même

² Provenant d'un don

³ Relatif à des individus de différentes espèces

Ce manuscrit est composé de cinq chapitres :

Chapitre I : Une étude bibliographique permet d'introduire le contexte de ce travail, les besoins en ingénierie tissulaire et les principes de base de matrice extracellulaire de culture (MEC). Les matériaux utilisés seront également présentée dans ce chapitre. Enfin, deux types de fonctionnalisations par volume et/ou par surface sont étudiés.

Chapitre II : La préparation des nanoliposomes de soja, de colza et de saumon, l'élaboration des films de chitosane, et des films de chitosane contenant des nanoliposomes sera présentée. Les méthodes utilisées pour la caractérisation physico-chimique des « matériaux » utilisés et l'étude de biocompatibilité/ biodégradabilité seront introduite.

Chapitre III : Avant d'incorporer des nanoliposomes dans la solution de chitosane, il est indispensable de bien connaître les caractéristiques physico-chimiques des nanoliposomes : la forme, la taille, la composition chimique, la classification dans l'échelle des lipides et leurs stabilités. Les propriétés de physico-chimique, mécaniques, et les caractéristiques de la surface seront caractérisés par du méthode multi-échelle, multi-techniques (FTIR-ATR, AFM, DMTA, DRX, etc.).

Chapitre IV : Afin d'améliorer la mouillabilité des films de chitosane contenant des nanoliposomes. Les paramètres optimisés obtenus à l'aide d'un plan d'expériences seront analysés dans ce chapitre. La surface (rugosité, mouillabilité, et composition chimique), et la variation de masse vont être étudiés et comparées avant et après le traitement plasma.

Chapitre V : Une étude préliminaire de biocompatibilité de films minces de chitosane contenant des nanoliposomes sera présentée dans ce chapitre. La cytotoxicité des MEC, l'adhésion cellulaire, et la prolifération des cellules CSM (cellules souches mésenchymateuses) ont été étudiées par les méthodes LDH (Lactate déshydrogénase), MTT (sel de tétrazolium, bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium), dosage d'ADN. L'influence des MEC sur le comportement cellulaire sera soulignée dans cette partie. Ce chapitre présente également une étude *in vitro* de biodégradabilité de films minces de chitosane contenant des nanoliposomes en utilisant une solution du PBS (phosphate buffered

saline/tampon phosphate salin) contenant 10 mg/l lysozyme (une enzyme présente dans le corps humain) durant 28 jours qui été utilisé dans ce cas là. La variation de masse, l'évaluation du degré de déacétylation, et l'angle de contact des films ont été déterminés au cours du temps et sera présenté.

CHAPITRE I. CONCEPTION ET FONCTIONNALISATION
DE FILMS MINCES ISSUS D'AGRO-RESSOURCE POUR
DES APPLICATIONS EN INGÉNIERIE TISSULAIRE
(ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE)

1.1. Ingénierie tissulaire

Concevoir et construire de nouveaux tissus possédant des propriétés comparables aux tissus naturels de l'organisme dans le but d'être utilisés en tant que substituts biologiques de certains tissus malades a de forts enjeux thérapeutiques et économiques. Ces derniers peuvent s'expliquer, notamment, en raison du nombre insuffisant de donneurs potentiels pour des transplantations d'organes (Langer, 2000) et du nombre important d'interventions chirurgicales (DIMETEX, 2010).

L'utilisation de biomatériaux dans l'ingénierie tissulaire suscite un intérêt croissant pour combler des espaces vides et pour reconstruire des tissus mous, comme les vaisseaux sanguins et la peau ou des tissus durs, comme les os (orthopédie/arthrose) (Drury and Mooney, 2003; Lee and Mooney, 2001). Il existe actuellement une majorité de produits dédiés aux applications osseuses (substituts dentaires, substituts osseux rachidiens, implants orthopédiques, ...) et viscérales (réparation et renforcement pariétal des hernies, éventration et prolapsus uro-génitaux, ...). Mais le nombre de produits commercialisés reste faible (une centaine) et certaines applications biomédicales souffrent d'un manque de produits et de choix.

1.2. Conception de Matrice Extracellulaire de Culture (MEC)

Le microenvironnement naturel des cellules est la matrice extracellulaire dont la composition biochimique et chimique, la structure tridimensionnelle, les propriétés mécaniques et dynamiques sont les facteurs les plus importants influençant le comportement des cellules et donc a fortiori la formation de tissu.

NB : Le lecteur pourra se référer aux ouvrages (Hay, 1991; Keeley and Mecham, 2013) pour de plus amples informations concernant la matrice extracellulaire.

La conception de matrices de support (ou matrice extracellulaire de culture MEC) fonctionnelles nécessite des travaux pluridisciplinaires où le développement de nouveaux **biomatériaux à fonctionnalités et architecture contrôlée** semble être la clef des défis scientifiques et industriels pour les prochaines années (Nicolas *et al.*, 2013).

Les biomatériaux modernes utilisés en tant que MEC doivent répondre à des exigences de performance et surmonter les difficultés pratiques. Un certain nombre de facteurs

techniques doivent être pris en compte dans la sélection et le développement de nouveaux biomatériaux.

Tout d'abord, les biomatériaux doivent avoir les propriétés physiques et mécaniques adéquates pour que les cellules survivent dans l'environnement physiologique (Temenoff and Mikos, 2008). Deuxièmement, les biomatériaux doivent être biocompatibles, c'est-à-dire qu'ils soient fonctionnels pour l'application désirée sans provoquer d'effets indésirables. Les réactions indésirables telles que l'hémolytiques⁴, ou les réactions inflammatoires doivent être évitées (Brown *et al.*, 2010).

Ces matrices de supports doivent nécessairement posséder des propriétés spécifiques et répondre à des exigences communes de rigidité, de biocompatibilité, de rapport surface/volume, et ne doivent pas provoquer de réaction inflammatoire.

Dans de nombreuses situations cliniques, il est intéressant d'avoir un biomatériau dégradable (exemples : pour la suture des plaies ou la régénération de tissus), les résidus ou produits de dégradation ne doivent pas dans ce cas être toxiques et les produits de dégradation doivent être facilement évacués par les reins. Ces biomatériaux dégradables doivent satisfaire aux exigences du métabolisme physiologique, et la dégradation doit être effectuée soit par hydrolyse, soit par voie enzymatique (Bhatia, 2010). Deux réactions biochimiques se déroulent dans deux directions opposées: la première concerne la réaction de dégradation de biomatériau, la deuxième représente une série de réactions de prolifération de cellules et la régénération de nouveaux tissus (Zhu *et al.*, 2013). À ce jour, les données sur la cinétique de ces deux réactions sont peu connues.

Enfin, les biomatériaux doivent satisfaire à des exigences commerciales et des besoins cliniques. Le biomatériau pour un usage médical devrait être : 1) facilement livré par un dispositif commode ; 2) stable au stockage à température ambiante, ce qui minimise le temps de préparation ; et 3) facile à fabriquer dans un souci de rentabilité.

1.3. Choix du matériau de base pour l'élaboration de MEC

Une des originalités de ce travail de thèse consiste à utiliser des matériaux d'origine naturelle pour concevoir des MECs. Le choix des matériaux s'est porté sur les polymères issus d'agro-ressources et plus particulièrement sur le chitosane issu de la biomasse.

⁴Le résultat d'une transfusion de sang incompatible.

En effet, les polymères issus d'agro-ressource se divisent en deux catégories :

- 1) Les polymères biosourcés, synthétisés à partir de monomère issus de ressources renouvelables comme l'acide poly-lactique (PLA) ou l'acide ricinoléique (acide 12-hydroxy-9-cis-octadécénoïque).
- 2) Les biopolymères issus directement, soit de la biomasse tels que les polysaccharides (amidon, lignocellulose, chitosane/chitine), les protéines (gélatine, caséine, zéine, glutène...), les lipides ou les lignines, soit issus de microorganismes tels que les polyesters (Polyhydroxy alkanoates, PHA, ou polyhydroxy-butyrates, PHB ou polyhydroxybutyrates co hydroxyvalérate, PHBV ...).

Ces polymères trouvent déjà de nombreuses applications dans le domaine biomédical (Vert, 2007), en particulier, « *les polysaccharides, les protéines, et les polyesters issus de végétaux et des animaux constituent la famille des polymères naturels. Certaines de ces polymères font partie de notre alimentation, et ont été utilisés dans diverses applications humaines dans des excipients pharmaceutiques, prothèses, délivrance de médicaments, etc. Ces polymères sont connus pour être biocompatibles à l'environnement biologique et faciles à évacuer dans la dégradation métabolique* » (Aravamudhan *et al.*, 2014). Ces dernières peuvent également éviter la stimulation de réactions immunologiques chroniques et toxicité qui ont été souvent observées lorsque les polymères synthétiques existent (Mano *et al.*, 2007).

Dans ce travail nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux polysaccharides, car ils permettent aussi de valoriser la biomasse. Parmi les polysaccharides, le chitosane a été produit et largement appliqué dans le domaine biomédical. Le chitosane est préparé à partir de la désacétylation du biopolymère naturel le plus répandu, la chitine. Cette dernière est extraite de la carapace des crustacés tels que les crabes et les crevettes (Monzack *et al.*, 2011). C'est un polysaccharide composé de la distribution aléatoire de D-glucosamine (GlcN) liée en β (1-4) (unité désacétylée) et de N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) (unité acétylée) (Velema and Kaplan, 2006). La structure du chitosane est proche de celle de glycosaminoglycanes et en fait un candidat potentiel pour l'ingénierie tissulaire, en particulier du tissu conjonctif. Il est formé d'une chaîne rigide équipée d'une double hélice provenant de O3 et O5 ainsi que de faibles liaisons hydrogène intra-moléculaires O3 et O6 (Yamaguchi *et al.*, 2003). La frontière entre la dénomination chitosane et chitine correspond à un degré d'acétylation ⁵(DA) de 50 %,

⁵ Le pourcentage d'unités acétylées par rapport au nombre d'unités totales

en-deçà le composé est nommé chitine et au-delà chitosane. Dans notre cas le DA utilisé est inférieur à 25%. Le degré de déacétylation (DD) est le complémentaire du DA.

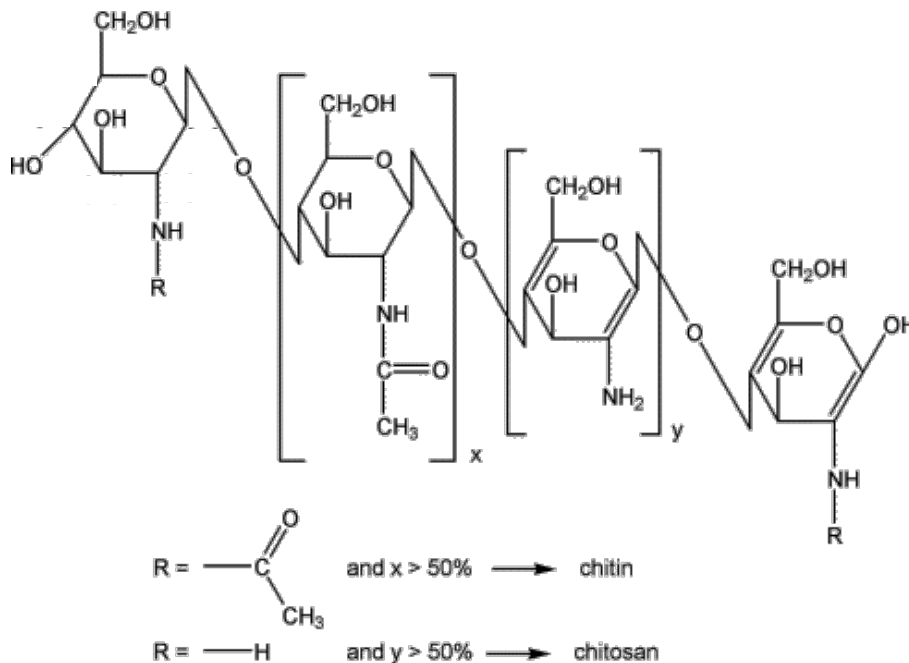


Figure I- 1 : Structure chimique semi-développée de la chitine et du chitosane montrant le caractère « copolymériques » des biomatériaux utilisés (d’après Pillai *et al.*, 2009).

Le groupement -NH_2 du chitosane est très susceptible d’être modifié. Par exemple, il peut-être réagit avec thiol (-SH), apporté par du réactif de couplage, conduit à former du chitosane thiolé (Muzzarelli and Muzzarelli, 2005) (Figure I-1). Sous certaines conditions physiologiques notamment $T \text{ } ^\circ\text{C} = 37 \text{ } ^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,4$, le chitosane peut être protoné et devient positivement chargé (Yang, 2011). La protonation du chitosane se produit généralement en milieu acide *in vitro* et *in vivo*, et accroît sa solubilité (Kim *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2004). Le chitosane protoné peut également former des complexes avec de nombreux types de molécules anioniques, telles que des acides nucléiques, et des cytokines (Je and Kim, 2012; Lai and Lin, 2009; Nandi *et al.*, 2013). Ces molécules natives sont alors protégées contre la dégradation par les milieux environnants et leurs biodisponibilités augmentées (Ishihara *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2002; Masuoka *et al.*, 2005; Muzzarelli *et al.*, 2012; Yang and Young, 2009).

Les propriétés du chitosane dépendent de sa masse moléculaire (M_w), de la proportion en unités déacétylés (DD) et de son taux de cristallinité (Ex: Mano *et al.*, 2007, Domard,

2011). Les propriétés physico-chimiques et biologiques (ex activité microbienne et capacité d'absorption) du chitosane, lui permettent de jouer un rôle très important dans le domaine des nouvelles applications biomédicales, notamment comme vecteur de médicaments ou d'autres substances thérapeutiques, et en médecine régénératrice (Crini *et al.*, 2009).

Zarzycki et Modrzejewska (2003) ont ainsi montré que le chitosane peut être utilisé pour fabriquer des organes ou des tissus artificiels, notamment en raison de son potentiel anti-thrombose (Zarzycki and Modrzejewska, 2003). H.S. Kas (1997) a montré que les gels de chitosane permettaient le transport d'un grand nombre de molécules thérapeutiques des plus simples telles que la caféine aux plus complexes tels que les protéines (Kas, 1997). Les travaux de Mi (1999) utilisent le chitosane mélangé au tripolyphosphate dans le domaine de la vectorisation par encapsulation pour la libération d'agents anti-cancéreux (Mi *et al.*, 1999). Une autre caractéristique du chitosane est sa capacité de stopper le saignement. En effet, certaines études ont montré que la charge positive du chitosane est un facteur favorisant la coagulation du sang et la cicatrisation (He *et al.*, 2013; Okamoto *et al.*, 2003). D'autres exemples de différents biomolécules incorporant au chitosane peuvent être trouvés dans la littérature (Lai and Lin, 2009; Lee *et al.*, 2002; Nandi *et al.*, 2013; Yang and Young, 2009).

Le tableau I-1, recopié de l'article de G. Crini (2009), présente quelques applications industrielles de la chitine et du chitosane pour des applications médicales et pharmaceutiques (Crini *et al.*, 2009). Cependant il apparaît que c'est la « faiblesse » des propriétés mécaniques du chitosane qui rend son utilisation en matrice de support délicat (Crini *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2010).

Champ d'application	Applications
Médecine	○ Accélération de la cicatrisation et de la guérison des blessures
Chirurgie reconstructrice	○ Traitement des lésions épidermiques
Chirurgie plastique	○ Stimulation de la régénération des tissus (prolifération des cellules)
Cancérologie ingénierie tissulaire	○ Matrice pour la régénération osseuse (substitut osseux, substitut de cartilage) ou pour la reconstruction de la peau (peau synthétique)
Biologie cellulaire	○ Stimulation du système immunitaire
	○ Vaisseaux sanguins artificiels
	○ Pansements
	○ Fils de sutures chirurgicaux bio-résorbables
	○ Agent anticoagulant
	○ Agent hémostatique
	○ Agent bactériostatique, spermicide
	○ Agent anti-infectieux, anti-bactérien, anti-fongique
	○ Agent anti-tumeur
	○ Encapsulation de cellules, de facteur de croissance
	○ Adsorption des plaquettes (protéines)
	○ Thérapie angiogénique
	○ Transfection (introduction d'ADN exogène dans des cellules)
	○ Rétention d'eau ou d'ions, membrane de dialyse (ingénierie biomédicale)
Pharmacie	○ Matériel absorbable avec possibilité de contrôle de libération de principes actifs (relargage de médicaments)
Dermatologie	○ Systèmes d'administration de médicaments par voie orale, systémique ou locale (via les muqueuses, voie nasale, oculaire, vétérinaire transdermique ou intra-tumorale)
Ophthalmologie	○ Adjuvant de vaccination
	○ Excipients
	○ Formation de gels et microcapsules avec des polymères anioniques
	○ Encapsulation/immobilisation d'enzymes
	○ Produits diététiques
	○ Crèmes de soins, produits dermatologiques (traitement de l'acné)
	○ Lentilles de contacts
Alicaments	○ Complément alimentaire (produits amaigrissants)
Neutraceutique	○ Faculté d'augmenter la satiété diminution du taux de cholestérol fixateur de graisses lutte contre l'excédent pondéral (obésité)
Dentisterie	○ Gel dentaire
Chirurgie dentaire	○ Implants dentaires

Tableau I- 1 : Applications industrielles de la chitine et du chitosane dans les domaines biomédical et pharmaceutique (Crini *et al.*, 2009).

Le chitosane peut être utilisé sous différentes formes telles que les micro / nano-capsules, les éponges, les hydrogels, les films, et les fibres (Muzzarelli and Muzzarelli, 2005). En outre, les produits dégradés de chitosane sont non-toxiques, et non-cancérogènes (Mi *et al.*, 2002). Mais la dégradation de chitosane dépend aussi de sa masse moléculaire, du taux de cristallinité mais aussi de la taille et de la forme de l'éprouvette (Zhu *et al.*, 2013).

☞ C'est pour ces diverses raisons que notre choix s'est porté sur ce biomatériau.

Afin de mieux connaître et de maîtriser les interactions physico-bio-chimiques des matrices de support, fonctionnalisées pour des applications en ingénierie tissulaire et

élaborées à partir du chitosane, avec leur environnement, nous avons décidé d'étudier séparément les propriétés apportées et/ou modifiées par différentes « stratégies ». Afin de mettre au point les procédés d'utilisation d'un dispositif d'électrofilage permettant de maîtriser l'architecture 3D, plus particulièrement l'influence des différents paramètres (haute tension, concentration/débit de la solution, distance entre l'extrémité d'aiguille et le collecteur, etc.). Cette mise au point a fait l'objet d'un PEPS « innovation thérapeutiques » en 2012-2014 auquel j'ai activement participé mais ne sera pas présenté dans ce manuscrit. De même la synergie entre architecture 3D et « nouvelles fonctionnalités » n'a pas été étudiée dans cette thèse et sera proposée comme une perspective à la fin de ce mémoire.

1.4. Fonctionnalisation d'un biomatériau en volume et/ou en surface

1.4.1. Fonctionnalisation en volume par incorporation de biomolécules molles

L'une des principales méthodes de fonctionnalisation des biomatériaux est d'incorporer en volume des biomolécules dans notre cas « molles » et issus de ressource naturelle. La méthode la plus utilisée et la plus simple consiste à mélanger directement les biomolécules choisies dans une solution de chitosane (de polymères en général) (ex: Beachley and Wen, 2010). Il a été montré que la méthode de l'incorporation directe dans des polymères offre l'avantage d'introduire un maximum de quantité de biomolécules et d'améliorer la bio-activité (Koh *et al.*, 2008). De plus, cette technique facilite la cinétique constante de libération des biomolécules via la dégradation de la MEC (Mano *et al.*, 2007, Kuo et Yeh, 2011).

☞ Dans le cadre de cette thèse nous avons choisis de fabriquer des nanoliposomes phospholipidiques à base de lécithine de saumon, soja et colza.

1.4.1.1. Choix des biomolécules à base de phospholipide sous forme de nanoliposomes

Dans la suite, nous nous intéresserons uniquement aux liposomes lipidiques. Pour de plus amples informations sur les liposomes le lecteur pourra se référer aux articles (Bangham and Horne, 1964; Maherani, 2011; Wallach, 1995) par exemple.

Décrits pour la première fois dans les années 60 (Bangham and Horne, 1964; Bangham *et al.*, 1965), les liposomes sont connus en raison de leurs structures sphériques. Dans notre cas ils sont composés de multicouches lipidiques et permettent de vectoriser des biomolécules vers des cibles cellulaires d'intérêt (Bowey *et al.*, 2014; Zucker and Barenholz, 2010). Les principaux composants des liposomes lipidiques sont des phospholipides (hydratation de lipides). Il s'agit des molécules amphiphiles qui présentent une tête polaire (partie hydrophile) et une queue apolaire (partie hydrophobe) (Figure I-2).

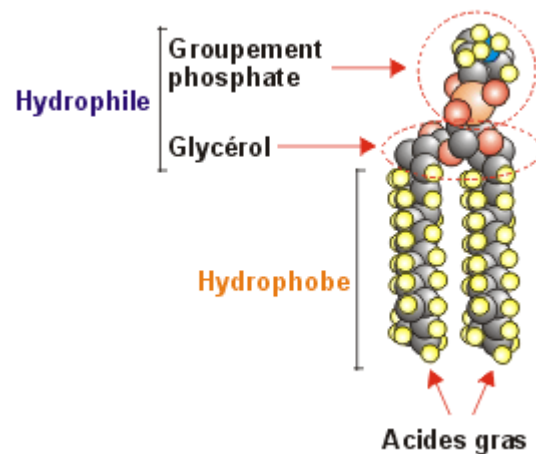


Figure I- 2 : Modèle moléculaire d'un phospholipide. Les groupements phosphate et glycérol présentent une tête polaire (partie hydrophile), les acides gras présentent une queue apolaire (hydrophobe). C en gris, H en jaune, et O en rouge. (d'après Schechter, 1997)

Cette organisation structurale permet de stabiliser la conformation des liposomes dans une solution aqueuse et minimise les interactions entre les chaînes hydrocarbonées et l'eau (Jesorka and Orwar, 2008). Une des structures possibles est la suivante : les têtes polaires des phospholipides se regroupent entre elles et s'orientent vers la phase aqueuse de part et d'autre de la bicouche formée. Les queues apolaires hydrophobes de chaque phospholipide, sont alors reliées entre-elles et situées au centre de la bicouche. Ce qui les rend inaccessibles à l'eau.

L'effet hydrophobe constitue la force principale qui gouverne la formation des bicouches lipidiques (Jesorka and Orwar, 2008). En effet, certaines études montrent que les phospholipides naturels forment spontanément des liposomes en milieu aqueux (Lorin *et al.*, 2004). Les phospholipides entrent également dans la composition des cellules nerveuses du cerveau et leur apportent le phosphore indispensable à leur fonctionnement. En plus de ce rôle essentiel, les phospholipides et leurs métabolites sont impliqués dans de nombreuses autres fonctions cellulaires dont les processus de prolifération et l'apoptose (Hubert, 2006).

Les liposomes utilisés dans cette étude ont une taille nanométrique (inférieur à 200 nm) on les appellera par la suite des nanoliposomes.

Dans cette étude, deux types de lécithine ont été utilisés dans la préparation des nanoliposomes : les lécithines d'origine végétale (colza et soja) et les lécithines d'origine marine (tête de saumon).

La méthode de préparation et les caractérisations seront présentées dans le chapitre 3. Précisons simplement que

1. les lécithines de soja et de colza sont constitués principalement de trois acides gras mono et poly insaturés: l'acide oléique (C18:1), et les acides linoléiques et linoléiques (C18:3),
2. la lécithine de saumon contient un pourcentage élevé d'acides gras polyinsaturés (AGPI), surtout l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22: 6) (Belhaj *et al.*, 2010; Kabri *et al.*, 2011).

Par analogie avec les travaux de Vladimir Torchilin ces nanovecteurs posséderont une double fonctionnalité (Torchilin, 2006) : ils serviront à la fois de protection aux principes actifs que l'on pourra introduire ultérieurement et posséderont un pouvoir antioxydant grâce aux acides gras polyinsaturés à longue chaîne qu'ils contiennent.

1.4.1.2. Objectifs du travail

Jusqu'à présent, les nanoliposomes utilisés dans le domaine pharmaceutique, dans le but d'augmenter la biodisponibilité des molécules actives (faiblement biodisponibles), sont composés de phospholipides végétaux et de synthèse.

L'objectif premier, est d'élaborer pour la première fois à notre connaissance, des films minces de chitosane contenant des nanoliposomes constitués de lécithines naturelles (qui pourrait permettre l'encapsulation de principes actifs) et d'étudier leurs caractéristiques physico-chimiques et « structurales » (mouillabilité, composition de surface, propriétés mécaniques, cristallinité et morphologie) pour évaluer :

- 1) si ces matériaux pourraient être utilisées en tant que matrice de support et pour évaluer

2) si les fonctionnalités apportées pourraient être intéressantes dans le domaine de la médecine régénérative.

Les résultats détaillés peuvent être retrouvés dans l'article, intitulé :

“Effects of nanoliposomes based on soya, rapeseed and fish lecithins on chitosane thin films designed for tissue engineering” H. Y. Zhang, E. Arab Tehrany, C. J. F. Kahn, M. Ponçot, M. Linder et F. Cleymand, *Carbohydrate polymers* (2012) 88 (2), pp 618–627.

1.4.2. Fonctionnalisation de la surface par des traitements plasma

Les traitements plasma permettent de modifier physiquement et chimiquement des surfaces, en particulier des polymères (Inagaki 1996; Yasuda, 1985, Chen 2008). Une modification chimique entraîne des réactions induisant des groupements hydrophiles ou hydrophobes sur les surfaces de polymère. Il est ainsi possible de transformer une surface initialement hydrophobe en une surface hydrophile avec un traitement plasma à l'oxygène et inversement en traitant la surface, par exemple avec un plasma de CF_4 . La modification physique implique des réactions de dégradation des chaînes des macromolécules en surfaces. Selon Inagaki *et al.* (2003) ces modifications physiques sont initiées par l'enlèvement d'un hydrogène des chaînes macromoléculaires et les réactions de dégradation sont initiées par la scission de liaison carbone-carbone (Inagaki *et al.*, 2003). Ces deux mécanismes ne se produisent pas séparément mais se produisent simultanément lors de l'exposition au plasma. Le facteur clé pour une modification efficace de la surface semble être la minimisation des réactions de dégradation. Ces dernières, ont lieu à la surface des polymères et peuvent dépendre de la composition de ces derniers et des conditions de plasma (composition du plasma, polarisation, débit de gaz).

Les plasmas sont généralement classés en deux grandes catégories : les plasmas chauds et les plasmas froids (Moser, E. M. *et al.*, 2010). La différence tient essentiellement à l'énergie et à la densité des particules chargées.

☞ Dans cette thèse, nous nous intéresserons uniquement au traitement par plasma froid.

Le traitement plasma froid permet de fonctionnaliser la surface des polymères par greffage de groupements fonctionnels et modifie donc la structure chimique et la morphologie

de la surface (Inagaki *et al.*, 2007). À ce jour, les groupements fonctionnels les plus couramment induits dans les réactions de modification de la surface sont des groupes fonctionnels carboxyle et amine (Figure I-3) (Sarra-Bournet *et al.*, 2006a, 2006b).

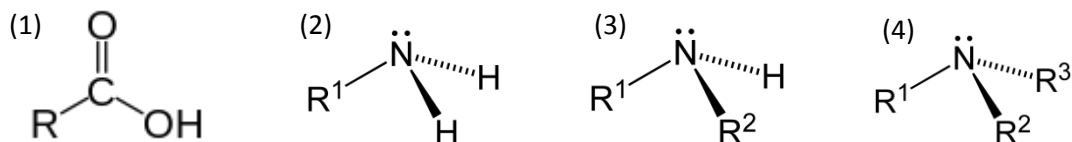


Figure I- 3 : Groupes fonctionnels carboxyle (1), amine primaire (2), amine secondaire (3) et amine tertiaire (4).

L'activation de la surface se fait donc par greffage de ces nouvelles espèces actives, ce qui conduit à l'augmentation de l'hydrophilicité (Chen *et al.*, 2010; Kral, M *et al.*, 2008).

Dans notre cas, une conséquence est que les propriétés d'adhésion et l'adhésion cellulaire des films de chitosane peuvent être améliorées (Luna *et al.*, 2011; Morra *et al.*, 1989). Il a par ailleurs été montré que la réponse cellulaire est directement et spécifiquement liée à ces molécules immobilisées par ce traitement (Bax *et al.*, 2009; Monchaux, 2007).

1.4.2.1. Plasma froid en post-décharge

☞ Pour un contrôle efficace du processus de création et de perte des espèces actives durant le dépôt, nous avons choisi d'utiliser un plasma post-décharge où l'action des ions et des électrons est inexistante pour ne laisser place qu'aux radicaux.

Ce type de plasma a été développé pour éviter les dégradations thermiques des matériaux sensibles causés par le bombardement des ions créés par la source plasma ou la décharge (Belmonte *et al.*, 2005; Temmerman *et al.*, 2005).

Les applications de la post-décharge sont nombreuses, parmi lesquelles on trouve notamment la modification de la mouillabilité des polymères (Canal *et al.*, 2009; Cui and Brown, 2002; Hegemann *et al.*, 2003). D'après les travaux de Hody *et al.* selon la nature du mélange gazeux utilisé et la nature du matériau traité, l'efficacité du traitement varie beaucoup (Hody *et al.*, 2006). Par exemple, dans le cas d'un dépôt d'ammoniac sur du poly-ethylene terephthalate (PET) par plasma, les radicaux N et/ou NH₂ qui se forment dans le

procédé plasma. Réagissent avec les groupements carboxyles du PET ; induisant une diminution de l'angle de contact de 130 ° à 15 °, ceci est dû à la présence des radicaux ammoniac (Narushima *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2012).

Il apparaît donc qu'une fois les polymères traités par plasma, l'analyse et la caractérisation de la surface sont nécessaires. Pour cela, la composition chimique, la mouillabilité et la topographie de surface ont en particulier été respectivement étudiées par FTIR-ATR, XPS, la mesure de l'angle de contact, et par AFM (chapitre IV).

1.4.2.2. Objectifs du travail

Les objectifs ici sont donc:

- (1) de modifier la structure de surface du chitosane par des traitements plasma à basse température post décharge,
- (2) d'évaluer les effets de la composition des gaz (O₂, N₂, CO₂, H₂), de la puissance micro-ondes, du temps de traitement et de la distance entre la source plasma et la surface des films sur les modifications de surface et
- (3) d'améliorer la mouillabilité des biomatériaux par traitement plasma.

**CHAPITRE II . ÉLABORATION ET CARACTÉRISATION
DES NANOLIPOSOMES, DES SOLUTIONS/FILMS DE
CHITOSANE ET DE CHITOSANE MÉLANGÉ AUX
NANOLIPOSOMES (MÉTHODE ET MATÉRIAUX)**

Ce chapitre traite

1) de la préparation des nanoliposomes de soja, de colza et de saumon, de l'élaboration des films de chitosane, et de la préparation de films de chitosane contenant des nanoliposomes à base de lécithine de soja, colza et saumon.

Dans la suite, le terme « nanoliposomes de X » sera employé pour « nanoliposomes à base de lécithine de X » où X est le soja, le colza, et le saumon.

2) des méthodes utilisées pour la caractérisation physico-chimique des « matériaux » utilisés.

3) des méthodes utilisées pour caractériser la biodégradabilité et la biocompatibilité des films

Étant donné que les techniques expérimentales sont maintenant bien connues seules les conditions d'utilisation seront précisées dans ce manuscrit. Le lecteur pourra se référer aux plus amples informations concernant les principales techniques utilisées, qui sont listées dans le Tableau II-1.

Caractérisation des nanoliposomes		Caractérisation des solutions/films	
Technique	Référence	Technique	Référence
Rhéomètre	(Dupuis, 2008)	Diffraction des rayons X	(Samuels, 1981)
Diffusion dynamique de la lumière	(Pecora, 1985)	Microscopie électronique à balayage (MEB)	(Ruste, 2013)
Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)	(Tranchant, 1996)	Microscopie à Force Atomique en mode contact intermittent (« Tapping® »)	(Rivoal and Frétigny, 2005)
Chromatographie sur couche mince	(Munier and De bièvre, 1979)	Goniomètre	(Kwok and Neumann, 1999)
Lame de Wilhelmy	(Drelich <i>et al.</i> , 2002)	Spectrométrie photoélectronique X (XPS)	(Moulder <i>et al.</i> , 1995)
		Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier FT-IR (ATR)	(Griffiths and Haseth, 2007)
		Torsional Harmonic AFM : TH-AFM	(Febvre and Pittinger, 2008)
		Analyse mécanique dynamique thermique (DMTA)	(Ponçot, 2009)

Tableau II- 1 : Principes des techniques utilisés pour la caractérisation des nanoliposomes, des solutions/films de chitosane et de chitosane mélangé auxnanoliposomes de soja, de colza et de saumon.

2.1. Élaboration et caractérisation des nanoliposomes

2.1.1. Élaboration des nanoliposomes

Les lécithines de soja et de colza, extraites par hydrolyse enzymatique, ont été fournies par l'entreprise « Solae ». La lécithine de saumon a été extraite de la tête de *Salmo salar* en utilisant le mélange de solvant (méthanol/chloroforme = 1 : 2) au Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LiBio) de Nancy, France (Linder *et al.*, 2001).

2 g d'une lécithine a été ensuite dissoute dans 38 ml de H₂O ultra-pure⁶ (type I) pour obtenir une solution de 5 % en masse de lécithine⁷.

La solution de lécithine est agitée de manière continue pendant 4 heures sous atmosphère inerte (azote). Elle subit ensuite un traitement par ultrason à 20 kHz et 200 W pendant 180 sec (1 s agir et 1 s arrêt). Pour éviter l'oxydation des nanoliposomes au niveau des doubles liaisons C=C, l'utilisation d'une basse fréquence pour les ultrasons, durant un temps court et sous une atmosphère d'azote ou d'argon a été utilisée (Lorin *et al.*, 2004). Les suspensions de nanoliposomes sont filtrées à l'aide d'une membrane de filtration de 0,2 µm et sont conservées dans des flacons stérilisés, à l'abri de la lumière à T = 4 °C et sous pression atmosphérique (P = 1,013x10⁵ Pa).

2.1.2. Caractérisation des nanoliposomes

2.1.2.1. Microscopie électronique à transmission (MET) : morphologie

Un microscope électronique à transmission de type « Philips CM200 » a été utilisé afin de caractériser la morphologie des nanoliposomes. Une tension d'accélération de 200 kV a été utilisée. Les images recueillies sont enregistrées à l'aide d'une caméra CCD de type « Olympus ». Un réactif acétate d'uranyle (VI) (UO₂(CH₃COO)₂) a été utilisé qui permet de métalliser des nanoliposomes afin de leur donner une coloration négative (ce produit apparaît plus clair en MET). Sa préparation est décrite dans l'Annexe-1.

⁶ Résistivité : 18,2 MΩ.cm à 25 °C (= Conductivité : 0,055 µS/cm à 25°C). Carbone Organique Total (COT) : inférieur à 5 ppb. Bactéries : inférieur à 0,1 CFU/ml.

⁷ 2 g lécithine / (2 g lécithine + 38 g l'eau) × 100 % = 5 %, la masse de 38 ml d'eau = 38 g

2.1.2.2. Diffusion dynamique de la lumière (DDL) : rayon hydrodynamique, mobilité électrophorétique, potentiel zêta et distribution de la taille des nanoparticules,

Le rayon hydrodynamique moyen, la distribution de la taille, la mobilité électrophorétique et le potentiel Zêta des nanoliposomes en suspension ont obtenues par diffusion dynamique de la lumière (DDL) en utilisant un appareil « Zetasizer Nano ZS » de la société Malvern™.

Rayon hydrodynamique

Le diamètre hydrodynamique des particules, $d(H)$ (en mètre), est calculé à partir de la loi de Stocke-Einstein (Einstein, 1956):

$$d(H) = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad \text{Formule II-1}$$

Où k_B est la constante de Boltzmann ($1,3806488 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$), T est la température mesurée (en Kelvin), η est la viscosité dynamique du fluide (en Pa.s), et D coefficient de diffusion à faible concentration dans l'eau ultra-pure (en $\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$), qui est déterminé par la formule de Wilke-Chang (Wilke and Chang, 1955). Ici la température de mesure est égale à 25 °C (298 K), la solution de nanoliposomes est diluée à 0,025 % (en volume), donc on considère que la viscosité dynamique de la solution de nanoliposomes est égale à celui de l'eau (1 mPa.s à 25 °C).

Mobilité électrophorétique

Cet appareil permet également de mesurer la mobilité électrophorétique des particules en dispersion, ou des molécules en solution. La mobilité d'une particule en solution résulte directement de sa charge électrique superficielle sous l'effet de l'attraction ou la répulsion d'autres particules chargées environnantes. Sous l'action d'un champ électrique, la vitesse de déplacement de cette particule est appelée vitesse électrophorétique (v_e). Le rapport de l'amplitude de cette vitesse et l'amplitude du champ électrique définit la mobilité électrophorétique qui est notée u_e ($\text{m}^2/\text{V.s}$) » (Delgado *et al.*, 2007).

Potentiel Zêta

Le potentiel zêta ζ représente le potentiel électrostatique des particules dans la solution. Sa valeur permet de déterminer la stabilité des suspensions en milieu aqueux et donc d'évaluer les forces de répulsion entre les particules en solution. Lorsque la valeur absolue du potentiel zêta est supérieure à 30 mV, la suspension est considérée comme stable et les nanoparticules ne devraient pas s'agréger ni précipiter. En revanche, si la valeur absolue est inférieure à 30 mV, la suspension devient instable et les risques d'agglomération, de floculation et de précipitation sont grands.

L'expression qui relie la mobilité électrophorétique u_e au potentiel zêta ζ de la particule est connue sous le nom de l'équation de Helmholtz-Smoluchowski (Delgado *et al.*, 2007) (Formule II-2).

$$u_e = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \zeta}{\eta} \quad \text{Formule II - 2}$$

Où ε_0 permittivité du vide (appelée aussi constante électrique, sa valeur est $8,85 \times 10^{-12} \text{ kg}^{-1} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{A}^2 \cdot \text{s}^{-4}$), ε_r permittivité relative du milieu (appelée aussi constante diélectrique), qui est égale à $29,3 \text{ kg}^{-1} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{A}^2 \cdot \text{s}^{-4}$ (constante diélectrique de l'eau ultra-pure) car la solution de nanoliposomes est diluée à 0,025 % (en volume). η , la viscosité dynamique du milieu, qui est égale à 1.003 Pa.s (viscosité dynamique de l'eau ultra-pure à 20 °C).

Indice de polydispersité

Dans nos cas, l'indice de polydispersité correspond à la largeur à mi-hauteur de la distribution en tailles des particules. L'indice de polydispersité peut être calculé par la formule II-3

$$Pdl = \frac{P_d}{D} \times 100 \% \quad \text{Formule II - 3}$$

où P_d représente à la largeur à mi-hauteur de la distribution, D est le rayon hydrodynamique moyen.

Protocole expérimental

Les mesures ont été réalisées selon le protocole suivant:

- Agiter la solution de nanoliposomes (dilué 250 fois) pendant 10 minutes ;
- Mesurer le pH de la solution de nanoliposomes ;
- Introduire 1 ml de la solution de nanoliposomes dans le capillaire ;
- Déposer le capillaire dans l'enceinte de l'appareil Zetasizer Nano ZS
- et soit mesurer la taille des nanoliposome par le mode « size » soit utiliser les modes NNLS (Non-Negatively Constrained Least Squares) et Contin, pour mesurer la mobilité électrophorétique et le potentiel Zêta.

2.1.2.3. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) : analyse des acides gras

La méthode d'analyse des acides gras consiste à effectuer une réaction de saponification de la fraction lipidique de lécithine pour produire des esters de glycérol. Les acides gras obtenus sont ensuite substitués par un groupement méthyle (-CH₃), ce qui les rend plus volatils. Les différents acides gras présents dans les lécithines, sont alors analysés par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG), et identifiés par des pics de rétention en fonction du temps sur le chromatogramme. L'identification des molécules est rendue possible à l'aide des standards et leur quantification par une calibration interne.

Les standards internes utilisés sont AGPI 1 (origine végétale) et AGPI 2 (origine marine). Les réactifs et les matériels nécessaires à l'analyse des acides gras sont présentés dans l'Annexe-2. Les mesures ont été réalisées selon le mode opératoire décrit par (Ackman, 1998). Après la décantation⁸, la phase organique est récupérée et analysée par CPG munie d'un Détecteur à Ionisation de Flamme (DIF) (Iatron Laboratories Inc., Tokyo, Japan). Un volume d'échantillon fixé à 1 µL est directement injecté dans une colonne capillaire. L'azote utilisé comme gaz vecteur est réglé à une pression de 200 kPa. Le mélange N₂, O₂ et H₂ sont respectivement réglés à une pression de 100 kPa et 60 kPa. La température initiale du four est de 145 °C. Elle est maintenue pendant 5 minutes. La température est ensuite augmentée de 2 °C/min jusqu'à 210 °C où elle est maintenue pendant 10 minutes. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont fixées à 260 °C.

⁸ Une opération de séparation mécanique, par différence de gravité de phases non-miscibles dont l'une au moins est liquide

2.1.2.4. Chromatographie sur couche mince : détermination des différentes classes de lipides

Les différentes classes de lipides sont déterminées à l'aide de la chromatographie sur couche mince (Iatroscan MK-5) couplée avec le DIF. Elle permet de séparer, d'identifier et de quantifier de très faibles quantités d'échantillons de lipides (quelques nanogrammes). La limite de résolution du chromatographe sur couche mince est de l'ordre de 0,5 ng. Le mode d'emploi pour déterminer des différentes classes de lipides est détaillé dans Annexe-3. Les étalons utilisés sont détaillé dans Annexe-4.

2.1.2.5. lame de Wilhelmy : mesure de la tension de surface des solutions de nanoliposomes

De nombreuses méthodes ont été utilisées pour mesurer la tension superficielle d'un liquide parmi elles ont trouvé (1) la lame de Wilhelmy, (2) l'anneau de Du Noüy, ou (3) la force de traction maximale d'une barre immergée (Abdelwahe, 2011). La méthode la lame de Wilhelmy a été utilisée dans cette étude pour mesurer la tension superficielle d'une solution de nanoliposomes à l'aide d'un tensiomètre « Krüss K100 ». Le platine a été choisi comme matériau de la lame en raison de son inertie chimique et de la facilité de son entretien. Avec une énergie libre de surface très élevée, le platine peut être facilement mouillé et forme un angle de contact θ de 0° ($\cos \theta = 1$) avec les liquides.

Protocole expérimental

- 20 ml de solution de nanoliposomes de soja, de colza et de saumon ont été préparés et stockés à quatre températures déterminées (4 °C, 25 °C et 40 °C) pendant 12 jours ;
- La mesure de la tension superficielle de solutions (trois essais par solution) a été effectuée tous les trois jours avec une température contrôlée à $25 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$.

2.2. Préparation et caractérisation des solutions/films de chitosane et de chitosane mélangé aux nanoliposomes à base de lécithine de soja, de colza et de saumon

2.2.1. Élaboration des solutions/films

Le chitosane basse masse moléculaire a été fourni par Tokyo Chemical Industry co. Ltd. La masse moléculaire est 100 kDa, le DD est 85,9 %, et la viscosité est 265 mPa.s (0,5 % en masse/volume dans 0,5 % v/v de solution d'acide acétique). Nombreuses des études préliminaires réalisés à LIBio nous permet de déterminer une concentration optimisé, notamment pour minimiser la concentration de l'acide acétique, 2 g de chitosane a été dissout dans 99 ml de l'eau ultra-pure contenant 1 ml d'acide acétique afin d'obtenir une solution de chitosane 2 % (poids/volume)⁹ (pH = 5,56 à 25 °C). Cette solution a été agitée pendant 12 heures à température ambiante et filtrée avec un entonnoir (La taille des pores de la membrane est comprise entre 100 et 160 µm) avant d'être utilisé.

Ensuite, 10 ml de solutions de nanoliposomes ont été mélangés avec 90 ml de solution de chitosane et agités pendant 8 h afin de disperser les nanoliposomes dans la solution de chitosane à l'abri de la lumière.

100 ml de solution de chitosane mélangé aux nanoliposomes ont été versés dans une boîte de pétri carré (12 × 12 cm²). Le solvant a été évaporé sous la hotte pendant 48 heures à 25 °C. Pour un séchage complet, les films ont été conservés dans une boîte hermétique contenant du P₂O₅ sous forme de poudre. L'épaisseur finale du film mince a été mesurée par un micromètre numérique électronique (0-25 mm, 1 µm) selon la norme ASTM D 374-99 (D09 Committee, 2004).

2.2.2. Caractérisation physico-chimique des films de chitosane et de chitosane mélangé aux nanoliposomes à base de lécithine de soja, de colza ou de saumon

2.2.2.1. Colorimètre : couleur

⁹ 1 % (p/v) = 1g de soluté / 100 ml de solvant

Les couleurs des films ont été mesurées en utilisant un colorimètre Minolta CM, CR-210 (Minolta, Colombes, France) paramétré dans le système colorimétrique $L^*a^*b^*$ (CIE¹⁰Lab, 1976). Le paramètre L représente la clarté, mesurée de 0 -noir à 100-blanc. Le paramètre a^* se positionne sur un axe allant du vert (valeurs négatives de -120 de a^*) au rouge (valeurs positives de $+120$ de a^*). Le paramètre b^* se positionne quant à lui sur un axe allant du bleu (valeurs négatives de -120 de b^*) au jaune (valeurs positives de $+120$ de b^*). Les trois axes L, a^* et b^* se croise en un point 0 qui correspond au gris, tel que montré sur la Figure II-1. Les valeurs représentées sont la moyenne des mesures réalisées en triplicat à différents endroits choisis aléatoirement sur chaque film. Trois films ont été mesurés afin de garantir la répétabilité des mesures.

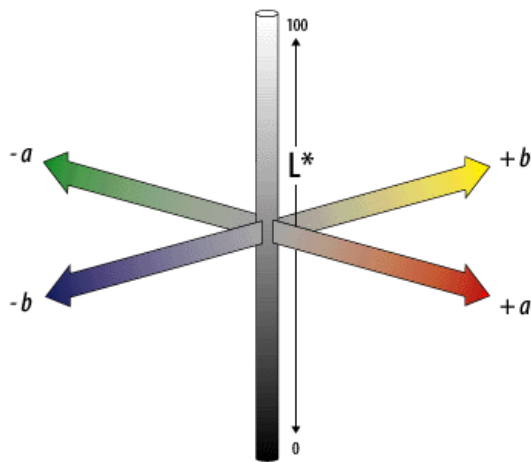


Figure II- 1 : Modèle colorimétrique $L^*a^*b^*$ (L^* : luminance ; a et b : gammes de couleur allant respectivement du vert au rouge et du bleu au jaune).

2.2.2.2. Diffraction des rayons X (DRX) : taux de cristallinité

Les rayons X sont produits par un générateur, dont la tension et l'intensité sont respectivement de 30 KV et 40 mA. Le rayonnement émis est la raie $Cu-K_{\alpha}$ ($\lambda=1,54056 \text{ \AA}$) qui est sélectionnée par un monochromateur puis réglée à l'aide d'un collimateur de 350 μm de diamètre. Afin de déterminer le taux de cristallinité du matériau, l'intensité I est corrigée à l'aide de la relation de Beer-Lambert (Formule II-4) qui tient compte du volume de matière absorbant en fonction de la position angulaire 2θ :

¹⁰ La commission Internationale de l'Eclairage

$$I = I_0 \cdot \exp\left(\frac{\mu \cdot e}{\cos(2\theta)}\right) \quad \text{Formule II-4}$$

où μ , coefficient d'absorption en cm^{-1} ,

e , épaisseur de l'échantillon (en μm),

I_0 , intensité du faisceau incident.

Le taux de cristallinité en masse a été déterminé à l'aide du logiciel «EVA» par la formule II-5 suivante:

$$\chi_c = \frac{C}{(C+A)} \quad \text{Formule II-5}$$

où C est l'aire des phases de cristallins, et A est l'aire des phases d'amorphe. Les contributions des phases cristallines et amorphes ont été modélisés par des fonctions gaussiennes (Bartczak *et al.*, 1996; Galeski *et al.*, 1991).

2.2.2.3. Microscopie électronique à balayage (MEB) : morphologie de surface

Un microscope « Quanta 200 FEG » de la société FEI en mode « vide partiel » a été utilisé pour visualiser la morphologie de la surface des films. Ce mode permet d'observer des détails de surface de matériaux biologiques sans aucune préparation préalable des échantillons. Un autre avantage de ce mode est d'éviter de détruire les échantillons fragiles par le faisceau des électrons ou sensibles au vide complet. Le détecteur à champ large a été utilisé pour effectuer cette analyse. La tension d'accélération du faisceau utilisée dans cette étude est de 10 à 15 kV. La taille du spot du faisceau a été choisie entre 4,5 et 5 (environ 20-30 nm) pour pouvoir d'obtenir une meilleure résolution lorsque des images sont effectuées. Les échantillons sont coupés sous forme carré de 3 mm² et collés sur un porte-échantillon qui est placé dans l'enceinte du MEB. Cette enceinte est alors mise sous vide par une pompe à diffusion d'huile afin d'atteindre un vide partiel de 60-90 mbar. L'alignement du faisceau est réalisé par une pièce polaire constituée de lentilles magnétiques et permet de régler les paramètres liés à l'astigmatisme et à la mise au point du faisceau.

2.2.2.4. Microscopie à Force Atomique en mode contact intermittent (IC-AFM ou « Tapping® ») : rugosité des surfaces des films minces

L'évaluation de la rugosité des surfaces a été effectuée par microscopie à force atomique (AFM) en mode contact intermittent (IC-AFM ou mode Tapping®) en utilisant un Dimension 3100 de chez BrükerNanoSurfaces (anciennement Veeco). Les images ont été effectuées à 20 ° C et à 30 % d'humidité. Des pointes Tap150 (modèle Veeco MPP-12100) avec une constante de raideur d'environ 5 N/m et une fréquence de résonance de 150 kHz ont été utilisées. La vitesse de balayage est comprise entre 0,5-1 Hz. Les mesures AFM ont été réalisées en « soft Tapping® » (faibles de force d'appui).

Les paramètres statistiques de rugosité ont été estimés par le logiciel de l'appareil commercial en utilisant la norme ASME B46.1 (1995). Après une extraction de profil (Figure II-2). Le logiciel définit la longueur d'évaluation l_r dans la direction générale du profil (axe x) ; elle sera utilisée pour le calcul des paramètres statistiques. On définit ensuite une ligne moyenne par la méthode de moindres carrés. $Z(x)$ représente la hauteur enregistrée de la pointe en chaque point d'ordonnée x .

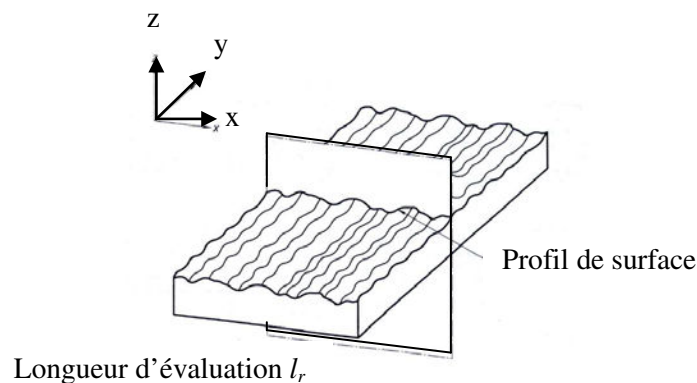


Figure II- 2 : Illustration d'une extraction de profil de surface.

Les paramètres déterminés sont :

- la rugosité arithmétique moyenne (R_a), qui est la moyenne arithmétique des valeurs absolues des hauteurs du profil. Il s'agit de la valeur moyenne de l'écart entre un point du profil et la ligne moyenne (Figure II-3).

$$R_a = \frac{1}{l_r} \int_0^{l_r} |Z(x)| dx \quad \text{Formule II-6}$$

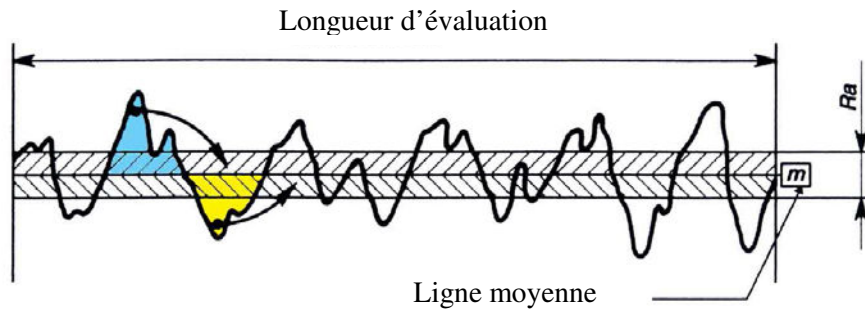


Figure II- 3 : Signification de R_a .

- la rugosité quadratique moyenne (R_q), qui est la moyenne quadratique des valeurs des hauteurs du profil. Elle est souvent appelé la rugosité RMS (« root mean square »). R_q est beaucoup plus représentative sur le plan statistique que R_a : de par sa définition, R_q prend mieux en compte les grands pics et grands creux. Deux surfaces avec un R_a identique peuvent avoir un R_q différent.

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{l_r} \int_0^{l_r} Z^2(x) dx} \quad \text{Formule II-7}$$

- l'asymétrie du profil S_k (R_{Sk}). Pour quantifier cette somme de l'asymétrie, on passe par la courbe de distribution d'amplitude à l'intérieur d'une longueur d'évaluation (Figure II-4 A). Dans le cas d'un profil « normal », les points du profil sont répartis de façon égale autour de la ligne moyenne, la courbe de distribution d'amplitude suit une loi gaussienne, S_k est égale à 0. Dans le cas d'un profil plein, la courbe de distribution est asymétrique à gauche, S_k est inférieur à 0. Dans le cas d'un profil creux, la courbe de distribution est asymétrique à droite, S_k est supérieur à 0.

$$S_k = R_{Sk} = \frac{1}{R_q^3} \left[\frac{1}{l_r} \int_0^{l_r} Z^3(x) dx \right] \quad \text{Formule II-8}$$

- l'aplatissement du profil K_u (R_{Ku}). Cette fois on regarde l'aplatissement de la courbe de distribution d'amplitude (Figure II-4 B). Dans le cas d'un profil

« normal » (la majorité des points du profil est autour de la ligne moyenne), K_u est égale à 3. Dans le cas d'un profil distribution large, K_u est inférieur à 3. Dans le cas d'un profil distribution serré, K_u est supérieur à 3.

$$K_u = R_{Ku} = \frac{1}{R_q^4} \left[\frac{1}{l_r} \int_0^{l_r} Z^4(x) dx \right] \quad \text{Formule II-9}$$

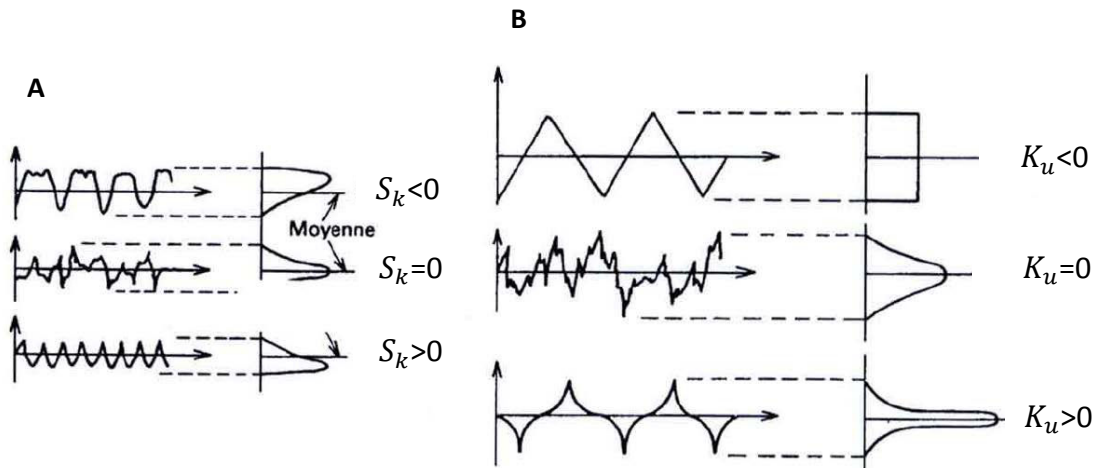


Figure II- 4 : Signification de $S_k(R_{Sk})$ et $K_u (R_{Ku})$.

2.2.2.5. Goniomètre : détermination de l'angle de contact et de l'énergie de surface

Les mesures des angles de contact ont été réalisées à l'aide du goniomètre Digidrop (GBX, France). Les énergies de surface des films de chitosane et de films de chitosane mélangés avec des nanoliposomes ont été calculées par la méthode d'Owens-Wendt (Formule II-10, 11) (Owens and Wendt, 1969) en utilisant les références de Tableau II-2.

$$\gamma_s^T = \gamma_s^d + \gamma_s^p \quad \text{Formule II-10}$$

$$\gamma_L (1 + \cos \theta) = 2 \sqrt{\gamma_s^d} \sqrt{\gamma_L^d} + \sqrt{\gamma_s^p} \sqrt{\gamma_L^p} \quad \text{Formule II-11}$$

Liquide	Composante polaire γ_p (mJ/m ²)	Composante dispersive γ_d (mJ/m ²)	Énergie de surface totale γ_T (mJ/m ²)
H ₂ O (résistivité = 18,2 M Ω ·cm)	51	21,8	72,8
Diiodométhane	0	50,8	50,8

Tableau II- 2 : La composante polaire, dispersive et l'énergie de surface totale de l'eau (résistivité = 18,2 M Ω ·cm) et de diiodométhane.

(Jańczuk *et al.*, 1996)

Mode opératoire

- Les mesures ont été effectuées dans une chambre hermétique par logiciel « Windrop » sur deux côtés des films minces (température égale à 23 °C et l'humidité relative égale à 39 %) ;
- Les gouttes uniformes de liquide (H₂O/diiodométhane) 0,75 μ L ont été prudemment déposées sur la surface de film mince à l'aide d'une seringue micrométrique ;
- Les mesures ont été effectuées 9 fois en trois positions différentes de chaque côté ;
- Les valeurs d'angle de contact ont été enregistrées 5 s après le dépôt de la goutte.

2.2.2.6. Spectrométrie photoélectronique X (XPS) : composition chimique d'extrême surface

La profondeur d'analyse de la technique XPS impose des conditions très strictes de préparation, manipulation et conservation des échantillons. Les échantillons sont préparés sous forme de films. Compte tenu du caractère peu conducteur des composés étudiés dans ce travail, une calibration des spectres est nécessaire avant toute exploitation. Le pic de cœur 1s des atomes de carbone saturé constitue la référence interne pour les composés étudiés. Son énergie de liaison est fixée à 284,6 eV.

Chaque analyse XPS est réalisée sous atmosphère contrôlée, dans une boîte à gants directement connectée au spectromètre. Le conditionnement sur le porte échantillon nécessite

une surface la plus plane possible afin de s'affranchir des effets d'états de surface. L'homogénéité des surfaces analysées constitue une condition préalable à l'obtention de spectres de bonne qualité. Pour certains composés particulièrement fragiles, un refroidissement de la chambre d'analyse par ajout d'azote liquide a été effectué afin de préserver la nature des échantillons.

Dans le cas de cette étude, un appareil XPS « axis ultra » « Delay-Line Detector » (Kratos, Japan) équipé d'une source Aluminium ($K_{\alpha} = 1186.6$ eV) et d'un monochromateur et travaillant à 10^{-9} mbar a été utilisé. La résolution spectrale est de 0,7 eV. Tous les spectres ont été enregistrés à 90° (angle de détection). La zone analysée est environ $700 \times 300 \mu\text{m}^2$. Le logiciel Visio 2.2.6 a été utilisé pour traiter les spectres et les proportions des différents groupements chimiques ont été déterminées selon les fonctions Gauss Lorentz.

2.2.2.7. Spectroscopie infra-rouge à transformée de fourier FTIR : groupements chimiques

Les groupements chimiques des films a été analysée par la spectroscopie infra-rouge à transformée de fourier en mode de réflexion totale atténuée (FTIR-ATR). Les mesures ont été réalisées à 20°C avec un spectromètre Tensor 27 mid-FTIR (Bruker, Karlsruhe, Germany) équipé avec une cellule optique Platine et un détecteur de type DTGS (Bruker, Karlsruhe, Germany). L'ouverture du diaphragme a été réglée à 6 mm. Le taux de balayage a été réglé à 20 kHz et 64 scans ont été réalisés pour chaque échantillon testé. Le balayage a été réalisé entre 4000 et 850 cm^{-1} avec une résolution de 4 cm^{-1} . Les données obtenues ont traitées par le logiciel OPUS livré par le fournisseur (Bruker, Karlsruhe, Germany).

Le traitement des données brutes a été le même pour chaque expérience à savoir :

- la conversion spectrale
- la correction atmosphérique $\text{H}_2\text{O} / \text{CO}_2$
- le lissage neuf points (fonction de Savitsky-Golay)
- la correction de la ligne de base 1
- la normalisation vectorielle
- la correction de ligne de base 2

Calcul du degré de déacétylation

La technique de FTIR-ATR a été proposée pour la première fois par Moore et Roberts (1978) pour déterminer le degré de N-acétylation du chitosane (Moore and Roberts, 1978). Cette méthode est relativement rapide comparant aux diverses méthodes tels que résonance magnétique nucléaire (RMN), le spectroscopie UV et les titrations (Baxter *et al.*, 1992). Il a été démontré que le degré de précision est acceptable, surtout pour les produits degré de déacétylation élevé (Domard and Rinaudo, 1983). La détermination du degré de déacétylation (DD) est très importante pour la prédiction des propriétés mécaniques des produits (Miya *et al.*, 1980).

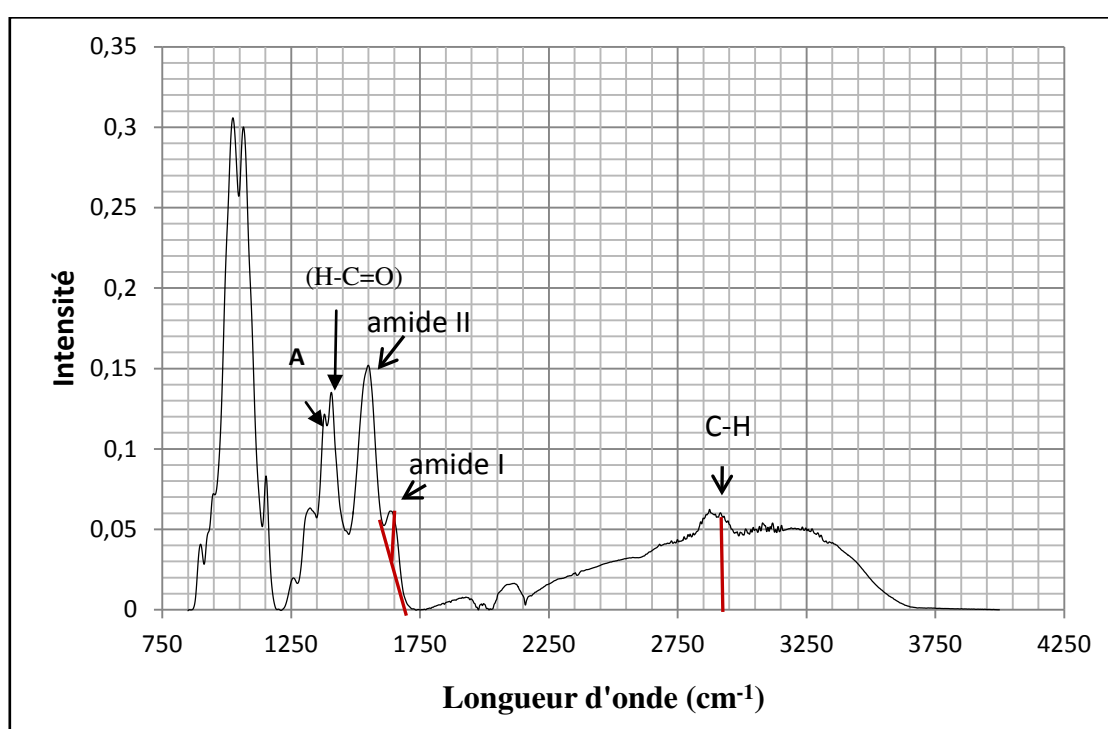


Figure II- 5 : Illustration de ligne de base dans le cas du film de chitosane seul, définie par la méthode de Baxter *et al.* (1991). A signifie les groupements amide III (C-N, N-H). Amide I signifie C=O, Amide II signifie C-N et N-H.

La ligne de base dans le cas du film de chitosane seul a été définie par la méthode de Baxter *et al.* (1991) (Figure II-5). Au moins quatre différents ratios d'absorption FTIR-ATR ont été proposés pour la détermination de DD : A_{1655} (amide I)/ A_{3450} (C-H) (Domard and Rinaudo, 1983; Domszy and Roberts, 1985; Sabnis and Block, 1997), A_{1550} (amide II)/ A_{2878} (C-H) (Sannan *et al.*, 1978), A_{1655} (amide I band)/ A_{2867} (C-H) (Miya *et al.*, 1980) and A_{1320} (-OH, -NH₂, -CO)/ A_{1420} (H-C=O) (Brugnerotto *et al.*, 2001). Les méthodes de Sannan *et al.*

(1978) et de Miya *et al.* (1980) ont été choisis pour déterminer le DD car A_{3450} n'apparaît pas sur le résultat de FTIR-ATR. En outre, d'après Domard and Rinaudo (1983), A_{1655}/A_{3450} est plus adapté aux DD de l'échantillon > 90 %.

$$DD \% = 100 - \frac{A_{1655}}{A_{2878}} \times \frac{100}{1,33} \quad \text{Formule II-12}$$

(Domard and Rinaudo, 1983; Sannan *et al.*, 1978)

$$DD \% = 100 - \frac{\frac{A_{1320} - 0,03822}{A_{1420}}}{0,03133} \quad \text{Formule II-13}$$

(Brugnerotto *et al.*, 2001)

$$DD \% = 100 - \frac{A_{1655}}{A_{2867}} \times \frac{100}{1,33} \quad \text{Formule II-14}$$

(Miya *et al.*, 1980)

2.2.2.8. Torsional Harmonic AFM : TH-AFM : propriétés nanomécaniques de surface

L'évaluation des propriétés nanomécaniques de surface a été effectuée par spectroscopie champ proche.

Il existe, à l'heure actuelle, de nombreuses méthodes basées sur l'AFM permettant de mesurer et/ou de cartographier les propriétés nanomécaniques (en particulier les modules de rigidité ou d'élasticité) de surfaces de matériaux et de nanomatériaux telles que la nanoindentation (courbe d'approche-retrait), le mode force pulsée, l'AFM de contact « résonant », l'imagerie en mode « force-volume », la microscopie de modulation de force ou encore l'imagerie de phase en mode amplitude modulée.

Le mode Torsional Harmonic AFM : TH-AFM, (ou HarmoniXTM) est un mode de spectroscopie champ proche développé en 2007 par Sahin *et al.* et introduit sur le marché en 2009 par Veeco (Sahin, 2007). Ce mode nécessite l'utilisation de leviers particuliers (en forme de « marteau » avec une pointe excentrée), qui améliorent notablement le rapport signal sur bruit comparé aux leviers classiques (Febvre and Pittinger, 2008). Ce mode permet, en plus de la topographie 3D, d'obtenir en temps réel avec une vitesse d'acquisition élevée, une cartographie du module de rigidité locale calculé via le modèle Derjaguin, Muller, Toporov

(ou modèle DMT) implémenté dans le logiciel commercial (Derjaguin *et al.*, 1975), la valeur de la force d'adhésion locale entre la pointe et la surface de l'échantillon, la valeur locale de l'énergie dissipée et la force d'appui en chaque point. En fait jusqu'à huit signaux peuvent être enregistrés et visualisés en simultané et en temps réel. Le lecteur pourra se référer à l'article (Febvre and Pittinger, 2008) pour plus de précision sur ce mode semi-quantitatif.

La fréquence de résonance et de torsion du levier (HarmoniXTM, HMX-10, Bruker nanosurface) est respectivement de 55 kHz et 951 kHz. La constante de raideur du levier est de 6 N / m maximum. Pour la détermination du module d'élasticité des leviers ont été étalonnés en utilisant un standard PS / LDPE (Sahin and Erina, 2008).

2.2.2.8. Analyse mécanique dynamique thermique (DMTA) : propriétés viscoélastiques

La DMTA (Dynamic Mechanical Thermal Analysis) a été utilisée pour déterminer les propriétés visco-élastiques des films (E' , E'' , et les températures de relaxation en particulier la température de transition vitreuse T_g) et estimer l'influence de l'incorporation des lécithines sous formes nanoliposomales en fonction de la température (Malheiro *et al.*, 2010).

Les éprouvettes utilisées lors des essais de DMTA sont découpés en rectangle 30 mm × 5 mm. Les largeurs et les épaisseurs sont été mesurées avant chacun des essais. La longueur de dispositif a déjà fixée à 10 mm.

L'appareil Netzsch DMA 242 C a été utilisé pour réaliser ces essais. Le dispositif intègre un four et un système capable de réaliser des sollicitations dynamiques. La fréquence de sollicitation est choisie à 10 Hz pour la mesure en fonction de la température, ce qui représente une fréquence classique pour les polymères. La température d'essai commence à -50 °C. Elle se termine aux alentours de 170 °C avec une cinétique de chauffe 2 °C afin de mieux observer la réponse du composite. L'ensemble des essais est entièrement contrôlé par logiciel « Proteus[®] ».

2.3. Détermination des propriétés biologique des films de chitosane seul et de chitosane mélangé aux nanoliposomes

2.3.1. Biocompatibilité *in vitro*

2.3.1.1. Cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMh)

Les prélèvements de cordon ombilical humain frais ont été réalisés par le CHU de Nancy. Après avoir obtenu le consentement des mères, les cordons ombilicaux de leur bébé sont collectés après la délivrance. Les cordons ont été stérilisés et stockés à 4 °C dans une solution physiologique stérile (solution de 0,9 % masse/volume de NaCl) avant traitement. Les cordons ombilicaux et les tissus mésenchymateux conjonctifs ont été découpés en petits morceaux (1 à 2 mm³). Les échantillons ont été incubés dans une solution de digestion de la collagénase¹¹ de type II (1 mg/ml) dans le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) pendant 18 h (5 % CO₂, 95 % d'humidité à 37 °C). La collagénase a été inactivée avec sérum de veau foetal (SVF). Les CSMh ont été mises en suspension à 5×10⁴ cellules par cm² dans le milieu DMEM complet contenant 1 g/L de glucose auquel sont ajoutés 10 % de FCS (Foetal Calf Serum), 100 U/ml de pénicilline et streptomycine, 2 mM de glutamine, et 2,5 mg/ml de fungizone. Les cultures sont maintenues à 37 °C (5 % CO₂, 95 % d'humidité relatif) jusqu'au jour d'utilisation. Le changement de milieu s'effectué tous les 2 jours.

Le phénotype des CSMh a été analysé par cytométrie de flux pour assurer leur natures mésenchymateuses (Dominici *et al.*, 2006). Les CSMh sont négatives pour les antigènes CD34⁻, CD45⁻ ; et positives pour les antigènes CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺.

Produits réactifs utilisés : DMEM low glucose (ref. 31885, Gibco), collagénase de type II (réf. NC9693955, Fisher), Foetal Calf Serum (FCS, ref. 12105C, Sigma-Aldrich), L-glutamin (ref. 11500626, Gibco), Penicillin/Streptomycin (ref. 11548876, Gibco) and Fungizone (ref. 11520496, Gibco).

¹¹ Enzymes capables de rompre les liaisons peptidiques du collagène. EC numéro : 3. 4. 24.

3.3.1.2. Préparation des films minces pour culture cellulaire

Toutes les manipulations ont été effectuées sous condition stérile. Les films de chitosane (2 % w/v), les films de cht+nsoja (0.5 %, 1 %, 2 %, v/v) et cht+nsaumon (0.5 %, 1 %, 2 %, v/v) ont été préparés suivant le protocole de section 2.2.1. Une neutralisation est réalisée par l'incubation des films dans une solution de NaOH 0,2 M (Synytsya *et al.*, 2012). Une stérilisation par UVB (longueur d'onde = 365 nm⁻¹) a été effectuée sur les deux côtés des films (15 min chaque côté). Les films sont coupés sous forme de disque d'épaisseur d'autour de 290 ± 8 µm de diamètre = 6 mm, 15 mm, et 22 mm à l'aide d'un emporte-pièce. Ensuite, les films coupés sont respectivement déposés dans les plaques culture multipuits de 96, 24, et 12 puits. Les tests sont réalisés en triple exemplaire pour chaque échantillon. Les plaques de 96 puits sont pour le test de LDH et MTT, les plaques 24 puits sont pour l'immunomarquage, et les plaques de 12 puits sont pour le dosage d'ADN.

3.3.1.3. Morphologie et test de viabilité cellulaire

Immunomarquage : morphologie & densité cellulaire

Il s'agit d'un marquage et d'une observation en microscopie de fluorescence de l'actine du cytosquelette et du noyau de cellules adhérentes/ensemencées sur les films après une période de culture de 7, 14 et 21 jours. Une plaque culture multipuits de 24 puits munis des films coupés a besoin. 1000/cm² de CSMh ont été ensemencées dans chaque puits.

Mode opératoire

- Lavage des cellules au PBS stérile (2 fois) sous hôte
- Fixation des cellules dans une solution de PFA à 4%, incubation durant 15 minutes à 37 °C
- Rinçage des cellules 5 minutes dans du PBS (non stérile)
- Incubation les cellules dans la solution de perméabilisation (PBS+0,5 % Triton) pendant 15 minutes.
- Rinçage au PBS durant 5 minutes (2 fois)
- Incubation durant 30 minutes dans la solution de marquage (phalloïdine 1/100 dans du PBS contenant 0,1 % de triton et 0,5 % de l'albumine de sérum bovin (ASB)

- Rinçage au PBS (3 fois)
- Incubation des cellules avec DAPI (1/250 de la solution mère et au 1/100 dans PBS)
- Incubation durant environs 30 secondes
- Rinçage au PBS (3 fois)
- Disposition d'une goutte de solution de montage sur le support
- Observation des cellules à l'aide du logiciel LAS Attention au réglage du microscope (luminosité, gain...) il faut obtenir des images avec un fond noir (sans reflet bleu ou vert)
- Première observation sur le microscope, une fois la mise au point effectuée, switcher sur l'ordinateur grâce au levier situé au-dessus de l'objectif du microscope.
- Dans le logiciel, se positionner sur l'onglet « acquérir ».
- Dans l'onglet « lambda » jouer avec l'exposition, le gain et « gamma » pour obtenir l'image la plus net possible avec un fond noir. Acquérir la photo et la sauvegarder.
- Une superposition des images sera nécessaire. Attention à ne pas bouger l'échantillon entre les deux photos afin qu'elles se superposent. Prendre la seconde photo.
- Basculer sur l'onglet parcourir, sélectionner les deux photos correspondant au marquage DAPI et phalloïdine. Acquérir superposition (bouton en bas à gauche) et la sauvegarder au format voulu.

Produits réactifs utilisés : Fluorescence Assay (réf. DNAQF-1KT, Sigma-Aldrich), TritonTM X-100 (réf. T8532, Sigma-Aldrich). Solution de montage (S3023, Dako)

Test de viabilité cellulaire

Les tests de viabilité cellulaires ont été réalisés. Le test de LDH, test d'activité métaboliques (MTT), et le dosage ADN (Hoechst 33258) sont choisis pour cette étude.

a. Test LDH

C'est un test de détection colorimétrique de la sécrétion de LDH. Le LDH est une enzyme exclusivement cytoplasmique et relativement stable. L'augmentation de l'activité de cette enzyme dans le surnageant des cellules permet de détecter une altération de la

perméabilité membranaire et par conséquent une mesure de la cytotoxicité. Dans une première étape, le LDH catalyse la réduction de l'Aldehyde dehydrogenase¹² (NAD⁺) en NADH et H⁺ par l'oxydation du lactate en pyruvate. Dans une seconde étape de la réaction, LDH utilise le NADH et le H⁺ formés pour catalyser la réduction du sel de tetrazolium (INT) en un précipité hautement coloré qui absorbe à 490-520 nm..

Produits réactifs utilisés : Kit LDH (Roche, réf. 11 644 793 001).

b. Test MTT

C'est aussi un test de détection colorimétrique mais de l'activité mitochondriale dans les cellules. Il est basé sur la réduction du 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) en un précipité le «formazan» (CAS No. 57360-69-7) violet dans l'eau (Figure II-6). Le « formazan » est imperméable aux membranes cellulaires. Il s'accumule donc dans les cellules saines. Le « formazan » permet de quantifier l'activité métabolique des cellules.

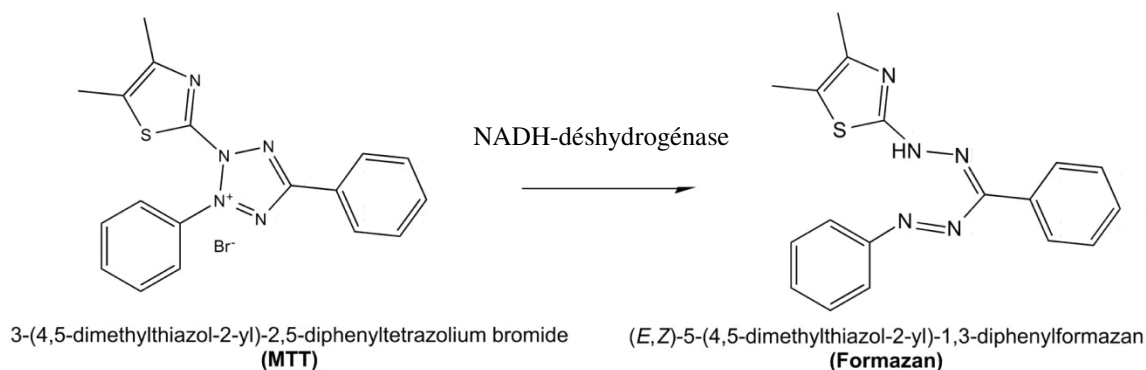


Figure II- 6 : Réduction du MTT en un précipité «formazan» violet dans l'eau par NADH-déshydrogénase.

(CAS No. 9028-04-0, EC. 1. 6. 5. 3) (Mosmann, 1983)

Produits réactifs utilisés : Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, réf. W387509), MTT (Sigma-Aldrich, ref. M2128).

¹² EC 1. 2. 1.3.

c. *Test de Hoechst 33258*

Le test de Hoeschst permet de doser l'ADN grâce au bisbenzimidazole (Hoechst 33258, CAS numéro 23491-45-4, EC numéro 245-690-6) qui est un agent intercalant de l'ADN¹³. Cette méthode fluorimétrique permet de visualiser l'ADN cellulaire. Tous les étapes doivent être effectuées à l'abri de la lumière (préparation le papier aluminium et plaque de 96 puits fond noir). Le mode opératoire de ce test se trouve dans Annexe-5.

Produits réactifs utilisés : bisbenzimidazole (Sigma-Aldrich, réf. B1155).

2.3.2. Biodégradabilité *in vitro*

Le tampon phosphate salin utilisé dans cette étude est préparé au laboratoire de Physiopathologie, Pharmacologie et Ingénierie Articulaires. Pour préparer 1 L du tampon, il faut 137 mM NaCl (8,0 g/L), 2,7 mM KCl (0,2 g/L), 10 mM Na₂HPO₄ (1,44 g/L), et 1,76 mM KH₂PO₄ (0,24 g/L). Les lysozymes sont présents dans tous les fluides corporels humains en quantités différentes. Le lysozyme de blanc d'œuf est utilisé dans cette étude [CAS numéro 12650-88-3, EC numéro 235-747-3, 50000 unités par mg] (Sigma-Aldrich, L-6876, 1g). La structure par rayon-X de ce lysozyme est ressemblé à celle de humain (Kristiansen *et al.*, 1998). Une neutralisation des films par l'incubation des films dans une solution de NaOH 0,2 M (Synytsya *et al.*, 2012). La concentration de lysozyme choisie dans cette étude est 10 mg/l correspondant à la teneur moyenne de lysozyme dans le sérum humain. En effet, la teneur moyen des lysozymes dans le sang est de 5,64 mg/l (étude réalisée par Fogelson sur 77 patients (Fogelson *et al.*, 1954)) et est compris entre 7 à 13 mg/l dans le sérum (d'après une étude réalisée par Hankiewicz and Swierczek (1974) sur 85 patients de 18 à 60 ans).

Protocole expérimental

- Incuber les films dans 0,2 M NaOH pendant 30 minutes;
- Rincer les films avec l'eau ultra-pure 6 fois pour que le pH de l'eau de rinçage diminue jusqu'à 7 ;
- Deux groupes d'éprouvettes ont été préparés : 3 éprouvettes coupées sous 3 formes (Δ ,

¹³ S'incorporer dans l'ADN

- O, Δ) pour déterminer la variation de masse (les différents formes permettent de distinguer les différents répétitions) ; 4 éprouvettes coupées en carré 5 × 6 cm pour déterminer l'angle de contact, l'évaluation de propriété chimique ;
- Ensuite, sécher les films à 50 °C pendant 24 h pour éliminer maximum de l'eau ;

À partir de cette étape, toutes les manipulations sont réalisées sous une hotte stérilisée:

- Stériliser les deux côtés de films sous UVB (365 nm⁻¹) pendant 30 minutes
- Préparer une solution PBS stérile contenant 10 mg/l lysozyme
- Mettre les films par catégorie (chitosane, cht+nsoja, cht+nsaumon) dans les bouteilles contenant respectivement 200 ml de solution de biodégradation.

Les éprouvettes (notées Δ , O, Δ) sont prélevées après 7, 14, 21, et 28 jours d'incubation afin de déterminer la variation de masse.

Le poids mesuré est rapporté à la masse sèche de départ par la formule suivante :

$$G = \frac{m_t - m_0}{m_0} \quad \text{Formule II-15}$$

Où G est le taux de gonflement à l'instant t, m_t est la masse pesée à l'instant t, m_0 est la masse d'initiation.

La mesure des angles de contact a été effectuée après 7, 14, 21, et 28 jours d'incubation. Les caractérisations MEB et FTIR-ATR sur les éprouvettes, coupées en 5 cm × 6 cm, ont été effectués après 7, 14, 21 et 28 jours d'incubation.

2.4. Traitement plasma froid

2.4.1. Dispositif expérimental

Un réacteur plasma en post-décharge a été utilisé. Le dispositif est représenté sur la Figure II-7.

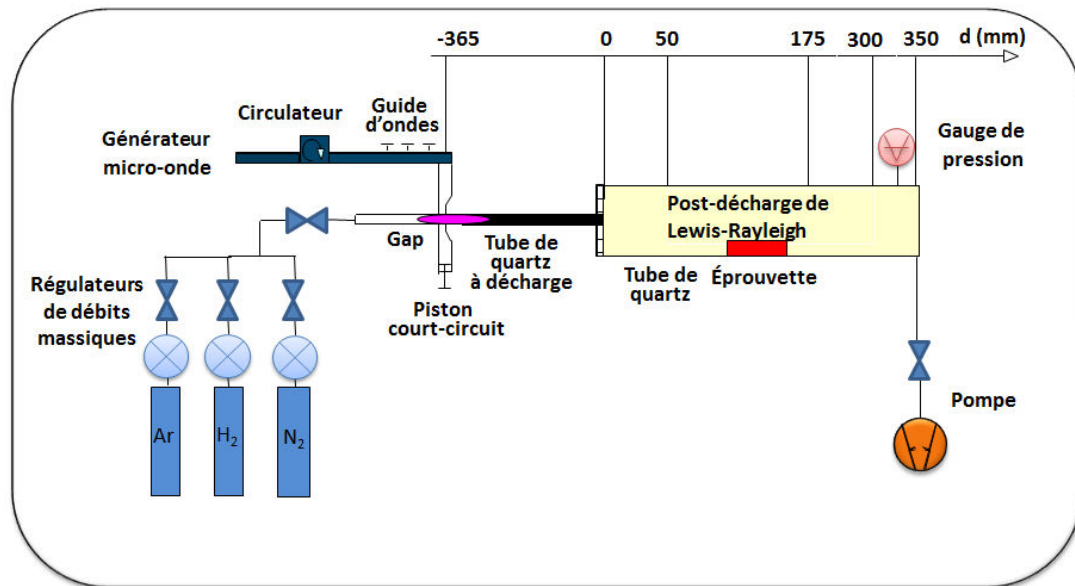


Figure II- 7 : Dispositif expérimental du réacteur plasma micro-ondes (Hody *et al.*, 2006).

Le plasma est créé par une excitation micro-ondes à 2,45 GHz d'un mélange gazeux Ar/N₂/H₂. L'oxygène n'est pas utilisé pour éviter la dégradation des nanoliposomes. Le débit des gaz est réglé à l'aide de régulateurs de débits massiques.

2.4.2. Optimisation des paramètres physico-chimiques du traitement plasma

2.4.2.1. Plan d'expériences

Une méthode du plan d'expériences-réseaux de Doehlert (Doehlert and Klee, 1972), a été utilisé pour déterminer les paramètres optimaux du procédé plasma froid post-décharge ; c'est-à-dire afin d'évaluer les effets et les interactions des facteurs les plus influents, à savoir la puissance micro-ondes, le rapport des teneurs en azote et hydrogène dans le mélange gazeux, le temps de traitement, et la distance de l'échantillon par rapport à l'extrémité du tube de décharge.

Le nombre d'expériences (N) à réaliser est déterminé par le nombre de paramètres (k) pris en compte et est donné pour la formule II-18:

$$N \geq k^2 + k + 1 \quad \text{Formule II-16}$$

Une des qualités remarquables de cette méthode est la possibilité d'attribuer des niveaux distincts aux différentes variables indépendantes : la première variable comporte 5 niveaux, la dernière est à 3 niveaux et toutes les autres variables intermédiaires présentent 7 niveaux. En fonction des contraintes techniques et économiques imposées par le procédé, il est possible de planifier la matrice d'expériences. Le Tableau II-3 présente les niveaux des différents facteurs (la puissance micro-onde, le rapport des teneurs en azote et hydrogène dans le mélange gazeux, le temps de traitement, et la distance de l'échantillon par rapport à l'extrémité du tube de décharge), ainsi que le domaine expérimental défini qui tient compte de l'angle de contact de l'eau.

Variables indépendantes (X_i)	Symbole	Valeur d'expérimentale	Niveau
Puissance micro-onde (W)	X_1	150, 225, 300, 375, 450	5
Rapport des teneurs en azote dans le mélange gazeux (N_2 %)*	X_2	0, 17, 33, 50, 67, 83, 100	7
Temps de traitement (s)	X_3	50, 81, 144, 175, 206, 269, 300	7
Distance de l'échantillon par rapport à la décharge (mm)	X_4	50, 175, 300	3

Tableau II- 3 : Domaine expérimental et niveau des facteurs.

Les symboles utilisés consistent à simplifier ces variables indépendantes. *Le débit d'Ar est toujours à 1000 sccm (cm^3/min à $0^\circ C$ et 1.013×10^5 Pa). Les paramètres fixes sont la pression (400 Pa), le débit total était de 1100 sccm (cm^3/min à $0^\circ C$ et 1.013×10^5 Pa. Ar: 1000 sccm, N_2 : 50 sccm, H_2 : 50 sccm). Les puretés gazeuses sont 99,995 %.

Une matrice d'expériences de 21 essais permet d'évaluer l'influence de chacun des paramètres et les interactions entre ces derniers. Quatre répétitions au centre du domaine sont réalisées afin d'évaluer l'erreur expérimentale (Tableau II-4). La réponse étudiée retenue est l'angle de contact de l'eau sur la surface des films minces. Il a été mesuré par goniomètre Digidrop. La mesure constitue décrit dans la section 2.2.2.5.

Expérience	Puissance micro-onde(X_1 (W))	Rapport des teneurs en azote dans le mélange gazeux X_2 (N ₂ %)	Temps de traitement X_3 (s)	Distance de l'échantillon par rapport à la décharge X_4 (mm)	L'angle de contact moyenne sur 9 mesures
1	450	50	175	175	90±5
2	150	50	175	175	73±16
3	375	100	175	175	25±1
4	225	0	175	175	78±19
5	375	0	175	175	99±2
6	225	100	175	175	23±1
7	375	67	300	175	45±11
8	225	33	50	175	74±7
9	375	33	50	175	67±21
10	300	83	50	175	66±7
11	225	67	300	175	59±4
12	300	17	300	175	48±6
13	375	67	206	300	52±22
14	225	33	144	50	53±3
15	375	33	144	50	36±0
16	300	83	144	50	64±3
17	300	50	269	50	31±1
18	225	67	206	300	69±2
19	300	17	206	300	38±10
20	300	50	81	300	68±1
21	300	50	175	175	54±15
22*	300	50	175	175	44±10
23*	300	50	175	175	49±7
24*	300	50	175	175	40±4
25*	300	50	175	175	39±8

Tableau II- 4 : Arrangement des 25 expériences sur les films de chitosane utilisant les réseaux de Doehlert et l'angle de contact mesuré après traitement.

*Les quatre dernières analyses répétées sont pour évaluer l'erreur expérimentale.

Le traitement statistique des réponses expérimentales a été réalisé à l'aide du logiciel NEMROD® (New Efficient Methodology for Research using Optimal Design (Mazerolles *et al.*, 1989) :

- Analyse de la variance, régression multilinéaire, analyse des résidus (REGSIA)
- Effets des facteurs principaux et interactions (MEFFET)
- Surfaces de réponse (SUREPE)

2.4.2.2. Préparation des éprouvettes

Les films ont été coupés pour atteindre une dimension de 2 cm × 1 cm et fixés sur un support métallique, puis l'ensemble a été inséré dans le tube de post-décharge. Ceci nous a permis de placer précisément l'échantillon dans le tube et d'éviter le déplacement de l'échantillon au cours du processus.

Pour ralentir l'effet de vieillissement et en particulier réduire la mobilité des chaînes moléculaires à la surface, les échantillons traités sont ensuite directement conservés à 4 °C avant d'être analysés (Yang *et al.*, 2009).

2.4.2.3. Analyse statistique des données

Pour l'analyse des données, ANalysis Of VAriance (ANOVA) et des régressions linéaires multiples ont été effectuées par le logiciel NEMROD® (Mazerolles *et al.*, 1989). Un modèle quadratique contenant 15 coefficients, y compris les termes d'interaction, a supposé pour découvrir les relations entre la réponse Y et facteurs expérimentaux X_i :

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} X_{ii}^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{Formule II-17}$$

D'où β_0 est le coefficient constant (ordonnée à l'origine), β_i est le coefficient linéaire, β_{ii} est le coefficient quadratique, β_{ij} et le coefficient d'interaction du second ordre.

Les surfaces de réponse et les traces de contours ont été développées en utilisant les équations polynomiales quadratiques qui ont été obtenues par la méthode des surfaces de réponses (response surface methodology, RSM en anglais) (Box and Wilson, 1992). Le seuil de signification a été fixé à $p = 0,05$. L'intervalle de confiance (IC) à 95 % et a été calculé pour chaque groupe de traitement.

2.4.2.4. Caractérisation physico-chimique des films avant et après le traitement plasma

La variation de masse a été déterminée avant et après traitement plasma par pesée (avec une précision de 0,1 mg). Une fois que le film a été traité, il a été conservé à 4 °C et l'abri de la lumière avant la mesure.

La variation de masse ΔM est calculée par la formule II-18:

$$\Delta M = \frac{m - m_0}{m_0} \quad \text{Formule II-18}$$

où m_0 est la masse initiale de l'échantillon avant le traitement en mg, m est la masse après le traitement en mg.

Les méthodes de caractérisation des films présentées précédemment ont également été utilisées, telles que Digidrop, XPS, AFM mode « Tapping[®] ».

**CHAPITRE III. INFLUENCE DE L'INCORPORATION
DES NANOLIPOSOMES SUR LES PROPRIÉTÉS
DES FILMS DE CHITOSANE**

3.1. Détermination de certaines caractéristiques physico-chimiques des nanoliposomes

Les produits alimentaires constituent l'unique source d'acides gras et sont indispensables pour l'homme d'autant plus qu'ils ne peuvent être synthétisés par l'organisme humain. Les acides gras exercent également de nombreuses fonctions biologiques en tant que (Alessandri *et al.*, 2004):

- Source d'énergie ;
- Constituants fondamentaux des phospholipides des membranes cellulaires ;
- Précurseurs de molécules régulant les fonctions cellulaires telles que : les prostaglandines et fonctions reproductrices, les thromboxanes et fonctions plaquettaires ;
- Régulateurs de l'expression des gènes impliqués dans leur propre transport et leur métabolisme ;
- Molécules riche en oméga-3 qui ont de plus des fonctions spécifiques dans le développement et la physiologie de la rétine, du cerveau et du système nerveux.

3.1.1. Indentification des acides gras dans les différentes lécithines

L'analyse détaillée des lécithines utilisées dans cette étude peut être retrouvée dans l'article (Zhang *et al.*, 2012) fournit à la fin du chapitre. Le Tableau III-1 donne la composition en acides gras exprimée en pourcentage relatif au total des acides gras identifiés dans les lécithines. L'acide gras $C_x : y_n - z$, où C_x indique nombre des atomes de carbone, y indique nombre de double liaison de carbone-carbone, et $n - z$ indique la position de la première insaturation.

Acides gras	Lécithine de soja		Lécithine de colza		Lécithine de saumon	
	%	Écart-type	%	Écart-type	%	Écart-type
C14:0	-	-	-	-	4,49	0,01
C15:0	-	-	-	-	0,32	0,02
C16:0	15,87	0,12	7,18	0,02	20,25	0,01
C18:0	3,46	0,01	1,54	0,03	4,65	0,01
ΣSAT	19,33	-	8,72	-	29,71	-
C16:1 n-9	-	-	-	-	5,01	0,01
C18:1 n-9	23,37	0,04	55,78	0,12	24,21	0,05
C18:1 n-7	-	-	-	-	3,39	0,02
C20:1 n-7	-	-	-	-	0,73	0,01
C20 :1 n-9	-	-	-	-	0,77	0,02
ΣMONO	23,37	-	55,78	-	34,11	-
C18:2 n-6	51,86	0,1	28,94	0,13	5,80	0,01
C20:2 n-6	-	-	-	-	3,36	0,01
C20:3 n-6	5,44	0,02	-	-	-	-
C22:5 n-6	-	-	-	-	0,21	0,01
C18:3 n-3	-	-	6,57	0,02	1,74	0,01
C18:3 n-4	-	-	-	-	4,12	0,01
C20:5 n-3	-	-	-	-	6,71	0,01
C21:5 n-3	-	-	-	-	1,27	0,01
C22:5 n-3	-	-	-	-	2,21	0,02
C22:6 n-3	-	-	-	-	10,78	0,09
ΣAGPI	57,30	-	35,51	-	36,20	-

SAT = acides gras saturés, MONO = acides gras mono-insaturés, AGPI = acides gras poly-insaturés

Tableau III- 1 : Liste des principales compositions chimiques et la teneur en masse (% en masse) des acides gras des lécithines de soja, de colza et de saumon.

Dans la lécithine de soja, les acides gras majoritaires sont C18 : 2 (n-6), (acides gras polyinsaturés), C18 : 1 (n-9) (acides gras monoinsaturés) et C16 : 0 (acides gras saturés). La lécithine de colza est composée à 56 % d'acide gras monoinsaturé C18 : 1 (n-9). Les lécithines de colza et de soja se composent donc essentiellement de trois acides gras mono et polyinsaturés : l'acide oléique C18 : 1 (n-9), l'acide linoléique C18 : 2 (n-6) et l'acide linoléique C18 : 1 (n-3). Les deux derniers acides sont très importants pour la santé mais le corps humain est incapable de les synthétiser (Coonrod *et al.*, 2008).

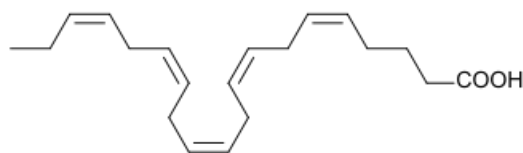
Ces résultats sont en adéquation avec les travaux de Lecerf (2011) montrant que le pourcentage d'acide gras saturé et insaturé peut atteindre 54 à 72 % en masse de la composition globale en lipides. Cette variation peut être dépendre de la génétique, la culture des plantes, les saisons, etc.

Le pourcentage des AGPI est plus élevé pour la lécithine de soja, mais la variété des acides gras polyinsaturés est plus élevée dans la lécithine de saumon. Neuf acides gras polyinsaturés, y compris oméga-3 et oméga-6 sont présents dans cette dernière et peut donc fournir plus de « récepteurs » spécifiques permettant l'endocytose¹⁴ (Arab Tehrany *et al.*, 2012; Düzgüneş and Nir, 1999). Les acides gras polyinsaturés permettent la synthèse de dérivés supérieurs et de métabolites (prostaglandines, leucotriènes) sous l'action d'enzymes (désaturase, élongase). Ils interviennent donc dans la constitution des tissus et des membranes cellulaires de l'organisme (Lecerf, 2011). Les résultats montrent que les teneurs (en masse %) de C22: 6 (n-3) et C20: 5 (n-3) dans la lécithine de saumon sont respectivement de 10,8 % et de 6,7 %. Ces deux AGPI ne sont pas présentés dans la lécithine de soja et de colza. La teneur des acides gras polyinsaturés peut influencer la flexibilité conformationnelle des molécules. D'après Feller *et al.*, (2001), les chaînes de polyinsaturés sont plus compressibles latéralement que leurs homologues saturés (Feller *et al.*, 2002). Ceci rend les membranes de nanoliposomes de saumon plus flexible que les autres. La flexibilité des AGPI est originaire de la rotation interne de liaison- σ , qui se trouve dans la double liaison des carbones (Law *et al.*, 2005).

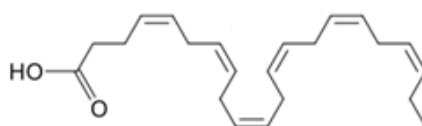
Les nanoliposomes de saumon contiennent différents types d'AGPI, en particulier, les acides gras éicosapentaénoïque (EPA, C20 : 5 n-3) et docosahexaénoïque (DHA, C22 : 6 n-3), représentés sur la Figure III-1, qui ont montré un fort potentiel dans la prévention de l'athérosclérose, de l'hypercholestérolémie et de l'hypertriglycéridémie plasmatique (Rambjør

¹⁴ Un processus au cours duquel la membrane d'une cellule enveloppe et absorbe une particule.

et al., 1996; Saldeen *et al.*, 1998). La régulation du tonus vasculaire, de la pression artérielle, de la viscosité sanguine et de l'agrégation plaquettaire sont également favorablement influencés par ces composants lipidiques (Freese and Mutanen, 1997; Ikeda *et al.*, 1994; Vognild *et al.*, 1998).



EPA (C20 : 5 n-3)



DHA (C22 : 6 n-3)

Figure III- 1 : Structure chimique de l'EPA et de la DHA.

Par ailleurs, les acides gras poly insaturés comme le C18 : 2 (n-6) (acide linoléique) présentent une teneur plus élevée à 52 % (en masse %) dans la lécithine de soja. C'est un composé capable d'augmenter la fluidité des membranes des nanoliposomes (Grazia Calvagno *et al.*, 2007). La fluidité des membranes favorise la formation des agrégats multi-vésiculaire, ce qui permet d'expliquer la large distribution de leur taille et leur taille moyen élevée (section 3.1.3).

3.1.2. Classification des lipides

Les lipides des différentes lécithines ont été analysés par chromatographie de couche mince (Iatroskan®). Le Tableau III-2 présente les pourcentages en masse des différentes classes de phospholipides contenues dans les lécithines.

La lécithine de saumon contient $38,9 \pm 0,8$ % de triglycérides (TAG) et $61,1 \pm 0,2$ % de fraction polaire. Les teneurs de fraction polaire et de TAG sont respectivement de $71,3 \pm 0,5$ %

et $28,7 \pm 0,1$ % pour la lécithine de colza. La lécithine de soja est plus riche en lipides polaires ($81,9 \pm 0,3$ %) que les deux autres types de lécithines. Sa teneur en TAG est $18,2 \pm 0,2$ %. Ces résultats seront corrélés avec les résultats de l'angle de contact (Section 3.3.4).

Lécithine	TAG (%)	Fraction polaire (%)
Soja	$18,2 \pm 0,2$	$81,9 \pm 0,3$
Colza	$28,7 \pm 0,1$	$71,3 \pm 0,5$
Saumon	$38,9 \pm 0,8$	$61,1 \pm 0,2$

Tableau III- 2 : Proportions en masse de différentes classes de phospholipides contenues dans les lécithines.

Ces lécithines, ont été utilisées pour élaborer des nanoliposomes de taille moyenne, de l'ordre de 174 nm pour le colza, de 190 nm pour le soja et de l'ordre de 129 nm pour le saumon (section 3.1.3).

3.1.3. Forme et taille géométrique des nanoliposomes

La taille et l'indice de polydispersité des nanoliposomes après le traitement à ultrasons ont été estimés immédiatement par DDL et sont présentés dans le Tableau III-3. Les résultats indiquent que le diamètre moyen des nanoliposomes de saumon est de 129 ± 2 nm avec un indice de polydispersité $I = 0,46$. Le diamètre moyen de nanoliposomes de soja et de colza est respectivement de 190 ± 3 nm et 174 ± 10 nm. L'indice de polydispersité de la solution de nanoliposomes de soja est de $I = 0,25$ et de colza est de $I = 0,28$.

Nanoliposomes	Taille (nm)	Indice de polydispersité
Soja	190 ± 3	0,25
Colza	174 ± 10	0,28
Saumon	129 ± 2	0,46

Tableau III- 3 : Liste des valeurs de la taille et de l'indice de polydispersité des nanoliposomes déterminées par l'appareil zétasizer.

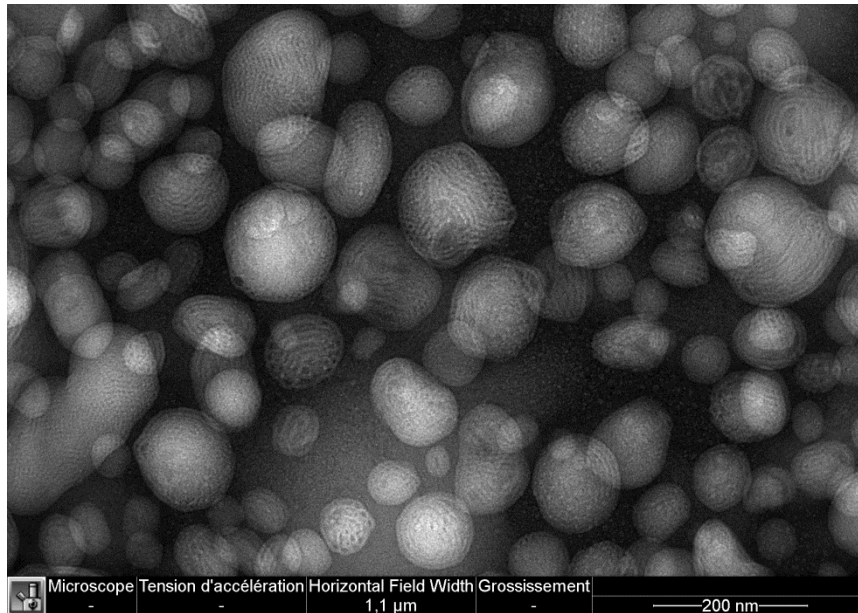


Figure III- 2 : Exemple d’une image de microscopie électronique en transmission des nanoliposomes de saumon effectuées au CC-MEM de l’IJL (barre échelle = 200 nm).

Les résultats de l’analyse des acides gras montrent que la teneur en acides gras poly-insaturés et mono-insaturés dépend de l’origine de la lécithine. La lécithine de soja contient une importante teneur en acides gras poly-insaturés (57,3 %) par rapport à celle de la lécithine de colza (35,5 %) et la lécithine de saumon (36,2 %). Ces résultats sont en adéquation avec les travaux de Grazia Calvagno *et al.* qui ont montré que l’accroissement de la teneur en acides gras poly insaturés affecte aussi la taille des nanoliposomes (Grazia Calvagno *et al.*, 2007). La taille des nanoliposomes dépend donc de la composition chimique de la lécithine.

En ce qui concerne l’indice de polydispersité, la valeur de celui-ci pour les trois solutions est inférieure à 0,5, cela-veut-dire que la distribution de la taille des nanoliposomes est relativement homogène. La solution de nanoliposomes de saumon présente la valeur la plus élevée. Ce résultat traduit la grande variété des acides gras polyinsaturés qui sont présents dans ces nanoliposomes.

Les multicouches de nanoliposomes de saumon peuvent être clairement observés dans la Figure III-2. En plus, le MET peut également fournir des informations en l’interaction entre les liposomes, tels que l’agrégation ou fusion, ainsi que leur stabilité (Maherani *et al.*, 2012).

3.1.4. Mobilité électrophorétique et potentiel zêta des nanoliposomes

Les valeurs de la mobilité électrophorétique et du potentiel zêta des nanoliposomes sont présentées dans le Tableau III-4.

La valeur absolue du potentiel zêta de chacun des nanoliposomes est supérieure à 30 mV. La suspension est considérée comme stable et les nanoparticules ne devraient pas s'agréger ni précipiter.

La valeur de la mobilité électrophorétique de lécithines varient entre -3 et -4 $\mu\text{mcm} / \text{Vs}$. Ceci est principalement dû à la charge électrique apportée par la fraction polaire de nanoliposomes. D'après les résultats obtenus par DDL, la valeur absolue de la mobilité électrophorétique de la solution de lécithine de soja (4,1 $\mu\text{mcm} / \text{Vs}$) est plus élevée que celles de lécithines de colza (-3,3 $\mu\text{mcm} / \text{Vs}$) et de saumon (3,9 $\mu\text{mcm} / \text{Vs}$). Cela peut s'expliquer par les différents types de phospholipides contenus dans les nanoliposomes de soja de colza et de saumon, tels que la phosphatidylsérine (PS), l'acide phosphatidique (PA), le phosphatidylglycérol (PG), le phosphatidylinositol (PI), la phosphatidyléthanolamine (PE), et phosphatidylcholine (PC). Au pH physiologique (7,4), ces phospholipides sont chargés négativement sauf le PC qui possède une charge positive (Garrett and Grisham, 2000). Ainsi, ces fractions anioniques sont probablement responsables de la mobilité électrophorétique négative (Chansiri *et al.*, 1999).

Nanoliposomes	Mobilité électrophorétique en $\mu\text{mcm}/\text{Vs}$	Potentiel zêta mV
Soja	-4,1 \pm 0,1	-52,3 \pm 0,9
Colza	-3,3 \pm 0,1	-42,5 \pm 0,9
Saumon	-3,9 \pm 0,1	-49,5 \pm 0,4

Tableau III- 4 : Potentiel zêta et la mobilité électrophorétique des nanoliposomes.

3.1.5. Tension superficielle des solutions de nanoliposomes

La tension superficielle des solutions de nanoliposomes de saumon est plus élevée que celles des deux autres (Tableau III-5).

Nanoliposomes	Soja	Colza	Saumon
Tension superficielle (nN/m)	26 ± 0,2	28 ± 0,5	34 ± 1,0

Tableau III- 5 : Valeurs de la tension superficielle des trois types de lécithines (soja, colza, saumon).

Les nanoliposomes de saumon contiennent différents types d'AGPI, en particulier, les acides gras EPA et DHA. D'après Garrett et Grisham, l'accroissement de la concentration d'AGPI favorise alors la fluidité de la membrane (Garrett and Grisham, 2000) et augmente la tension superficielle (γ_{surface}) de la multicouche. Les AGPI favorisent donc la migration des lipides au sein de la membrane cellulaire et, par voie de conséquence, accroissent la fluidité de celle-ci.

Les nanoliposomes de colza et de soja ont une faible tension superficielle (γ_{surface}) en raison de la rigidité des molécules, des acides gras saturés et des acides gras mono-insaturés. Cette rigidité est due à la faible teneur en double liaison C=C.

Ces résultats sont en adéquation avec les études de Leshem et al, (1988), qui ont montré que le degré d'insaturation de la position *sn-2* situé dans le groupe d'acyle gras (un groupe formé par la perte d'OH du groupe carboxy d'un acide gras) avait un effet remarquable sur la tension de surface entraînant une augmentation de la tension superficielle (Leshem *et al.*, 1988).

La stabilité des nanoliposomes

La stabilité des nanoliposomes a été évaluée à partir de solutions (contenant les nanoliposomes) maintenues à 4 °C pendant 12 jours, et par la mesure de leurs tensions superficielles par tensiomètre et de leurs tailles par zêtasizer tous les 4 jours.

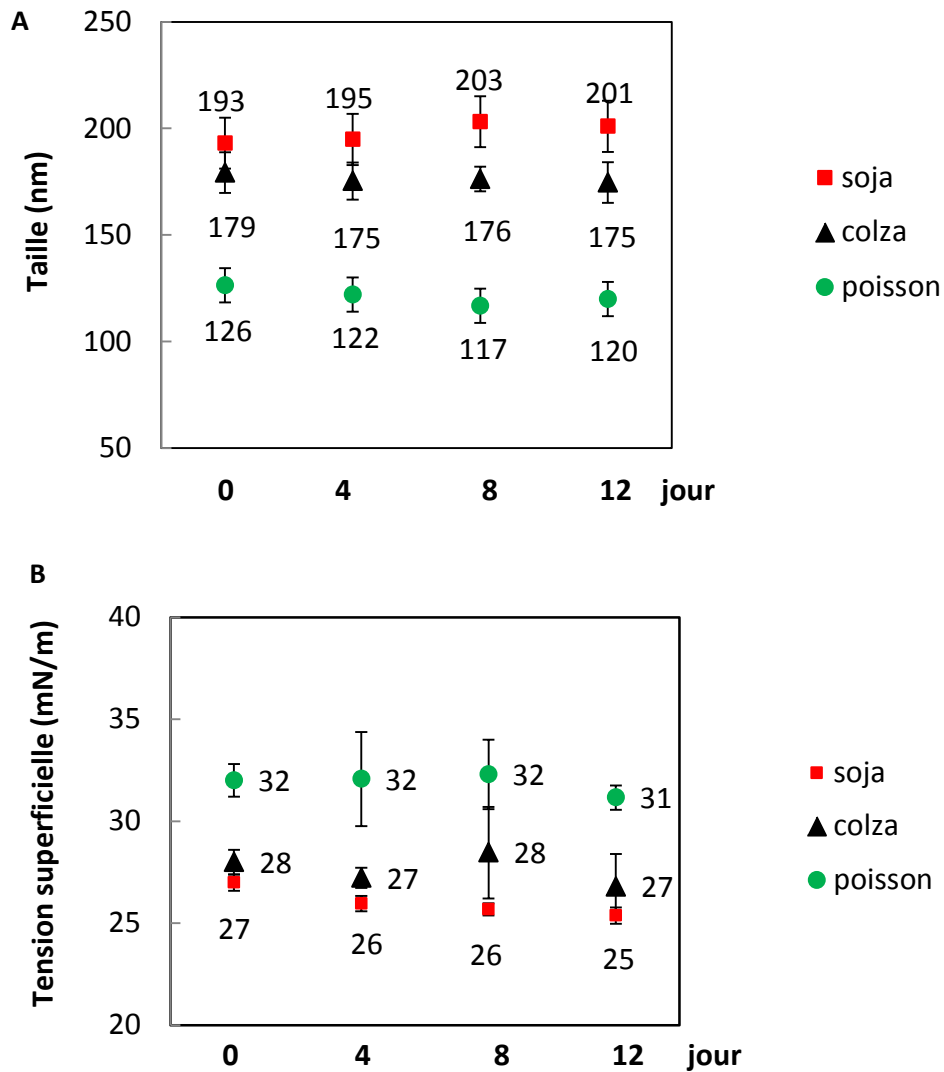


Figure III- 3 : Évaluation de taille des nanoliposomes (A) et de tension superficielle (B) pendant 12 jours de conservation à 4 °C.

Figure III-3 montrent que les nanoliposomes sont stables « en tension superficielle » et « en taille » pendant 12 jours de conservation à 4 °C. Les tailles de nanoliposomes de saumon sont toujours plus petites que celles de nanoliposomes de soja et de colza. En revanche, la tension superficielle de saumon est supérieure à celle de soja et de colza.

3.2. Tension superficielle de solution de chitosane seul et de chitosane mélangé aux nanoliposomes

D'après le Tableau III-6, la tension superficielle de la solution de chitosane mélangé aux nanoliposomes de saumon est plus élevée parmi les quatre systèmes. La solution de chitosane mélangé aux nanoliposomes de soja et de colza apparaissent la même, ce qui confirme que la tension superficielle des nanoliposomes de soja et de colza sont également identiques.

Solution	Chitosane	Cht+nsoja	Cht+ncolza	Cht+nsaumon
Tension superficielle	40±1	33±0,02	30±0,5	44±0,7

Tableau III- 6 : Tension superficielle des solutions de chitosane et de chitosane mélangé aux différents nanoliposomes.

3.3. Détermination de certaines propriétés physico-chimiques des films

Précisons que les deux surfaces des films ont été étudiées. La surface en contact avec la boîte de pétri est appelée face « verso » et celle en contact avec l'air est appelée face « recto », notés respectivement R et V.

Afin d'avoir une bonne reproductibilité sur les mesures de propriétés de surface, uniquement la face en contact avec la boîte de pétri – face « verso » a été utilisée pour les caractéristiques tels que l'angle de contact, AFM, XPS.

NB : Dans la suite, le terme « nanoliposomes de X » et/ou la notation nX sera employé pour « nanoliposomes à base de lécithine de X ». Le lecteur pourra se référer à l'article (Zhang et al., 2012) pour l'autre face et les différentes compositions en nanoliposomes.

3.3.1. Couleur et épaisseur

D'après le résultat de L*ab (Tableau III-7), le paramètre L* du film de cht+ncolza est légèrement plus grande que les autres films, cela veut dire que le film de cht+ncolza est plus

lumineuse et transparent que les autres. Les valeurs a (axe vert-rouge) et b (axe bleu-jaune) de cht+nsaumon sont plus élevés, c'est-à-dire que son couleur est plus rouge et jaune (plutôt orange), cela confirme bien l'image représenté dans Figure III-4.

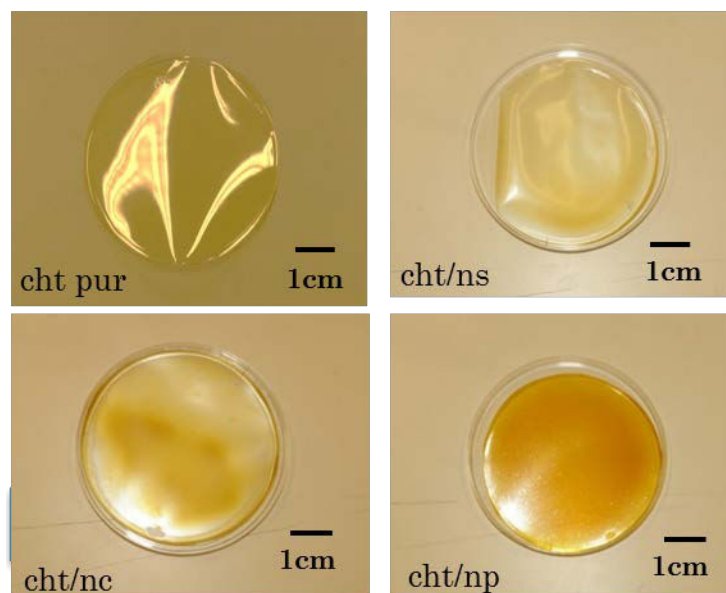


Figure III- 4 : Films de chitosane seul et de chitosane mélangé aux nanoliposomes.

	Chitosane	Cht+nsoja	Cht+ncolza	Cht+nsaumon
L	33,6±0,4	33,8±2,6	35,3±1,6	32,7±0,3
a*	0,1±0,05	0,6±0,4	1,1±0,3	4,3±0,2
b*	3,2±0,4	4,7±2,4	8,0±0,9	11,1±0,3

Tableau III- 7 : L*, a*, et b* des films de chitosane seul et de chitosane mélangé aux nanoliposomes.

	Chitosane	Cht+nsoja	Cht+ncolza	Cht+nsaumon
Épaisseur (µm)	116±8	153±15	162±24	140±12

Tableau III- 8 : Epaisseur de films de chitosane seul et de chitosane mélangés aux nanoliposomes.

D'après la mesure d'épaisseur, nous avons observé que le film du chitosane seul est plus fin et plus plat que les autres films (Tableau III-8). C'est un paramètre qui permet de corriger l'intensité I mesuré par DRX-GA à l'aide de la relation de Beer-Lambert (Formule II-4).

3.3.2. Taux de cristallinité

Les diagrammes de RX sont présentés sur la Figure III-5. Samuels (1981) a décrit pour la première fois les deux formes cristallines du chitosane. La forme I : orthorhombique de maille $a = 7,76 \text{ \AA}$, $b = 10,91 \text{ \AA}$, et $c = 10,3 \text{ \AA}$. Le pic de plus forte intensité apparaît à $2\theta = 11,4^\circ$, ce qui correspond au plan réticulaire (100). La forme II est également orthorhombique de maille $a = 4,4 \text{ \AA}$, $b = 10,0 \text{ \AA}$, et $c = 10,3 \text{ \AA}$. Le maximum d'intensité est observé pour $2\theta = 20^\circ$, ce qui correspond au plan réticulaire (100) (Samuels, 1981). Zong *et al.*, (2000) indique que la réflexion à $2\theta = 20^\circ$ diminue lorsque le film a été préparé par solvant casting dans une solution d'acide acétique (Zong *et al.*, 2000). Cela peut être expliqué par une modification partielle de la forme II vers la forme I causée par l'acide acétique. On obtient une chaîne de structure plus extensible (Zong *et al.*, 2000).

Dans cette étude, pas de pic apparaît au plan (100) pour le chitosane seul, au contraire, un « sursaut » apparaît à $2\theta = 19,8^\circ$ pour les films de chitosane mélangé aux nanoliposomes (Figure III-5). Le taux de cristallinité du chitosane augmente de 6 % à 8-11 %, cela veut dire que les nanoliposomes cristallisent le chitosane (Tableau III-9).

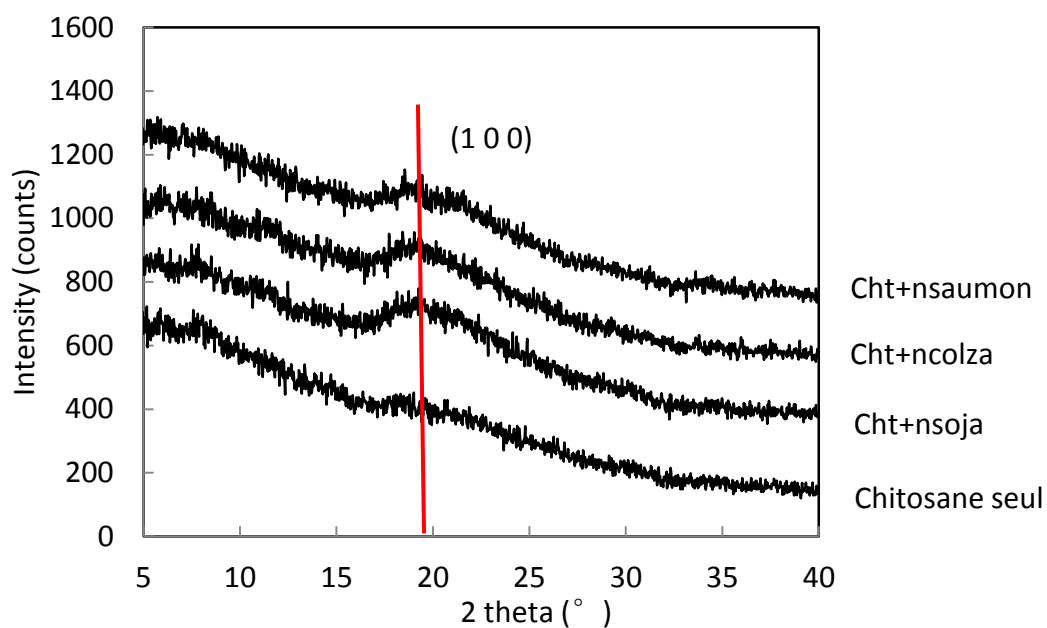


Figure III- 5 : Spectres de DRX-GA des films.

Chitosane seul			Cht+nsoja			Cht+ncolza			Cht+nsaumon		
<i>C</i>	<i>(C+A)</i>	%	<i>C</i>	<i>(C+A)</i>	%	<i>C</i>	<i>(C+A)</i>	%	<i>C</i>	<i>(C+A)</i>	%
63,2	(1086,5)	6	109,8	(1037,4)	11	88,7	(1074,3)	8	93,2	(1041,3)	9

Tableau III- 9 : Taux de cristallinité des films de chitosane seul et de chitosane mélangé aux nanoliposomes.

C représente l'aire des phases de cristallins, et *A* est l'aire des phases d'amorphe.

3.3.3. Identification des groupements chimiques par FTIR-ATR et XPS

Sur les spectres FTIR-ATR (Figure III-6), les pics correspondent aux C-N, ν (C-O-C), C-H, C-C, amide III (C-N, N-H), l'alcool tertiaire (C=OOR), amide I (C=O) et amide II (C-N et N-H) sont clairement observés pour les quatre films minces. Les bandes d'absorption :

de 1000 cm^{-1} et 1200 cm^{-1} représentent la structure de la saccharine ;

de 1050 cm^{-1} et 1074 cm^{-1} correspondent aux vibrations ν (C-O-C) ;

de 1143 cm^{-1} et 1155 cm^{-1} représentent la vibration des liaisons C-H et C-C ;

de 1325 cm^{-1} et 1390 cm^{-1} représentent la vibration de groupe amide III (C-N, N-H) ;

de 1368 cm^{-1} et 1412 cm^{-1} représentent la vibration de l'alcool tertiaire (C-OH) ;

de 1529 cm^{-1} et 1660 cm^{-1} correspondent aux vibrations de groupes amide I (C=O) et II (C-N, N-H).

Les pics correspondant aux liaisons spécifiques de phospholipides sont aussi clairement visibles :

de 1730 cm^{-1} et 1738 cm^{-1} correspondent aux liaisons esters (C=O-OR) ;

de 2844 cm^{-1} et 2868 cm^{-1} représentent les liaisons de méthylène ($-\text{CH}_2-$) ;

de 2911 cm^{-1} et 2916 cm^{-1} ce sont les liaisons de méthyle (CH_3).

Les pics et les groupes correspondants ont été rassemblés dans le Tableau III-10.

Par rapport aux films minces de chitosane seul, l'introduction de 10 % de nanoliposome de soja induit un décalage en fréquence de 20 cm^{-1} pour la vibration de la liaison C-N et de 19 cm^{-1} pour la vibration ν (C-O-C). La vibration de l'alcool tertiaire présente un décalage de 32 cm^{-1} , la bande amide II est décalée 40 cm^{-1} pour cht+nsaumon et cht+nsoja. Au contraire, les vibrations de bande amide I n'ont pas de décalage, cela-veut-dire, l'ajout des nanoliposomes ne change pas de la fréquence de vibration de l'amide I. Donc, Aucune nouvelle liaison n'est, a priori, pas créée lors de l'ajout de nanoliposomes dans du chitosane. C'est une simple incorporation entre la solution du chitosane et des nanoliposomes.

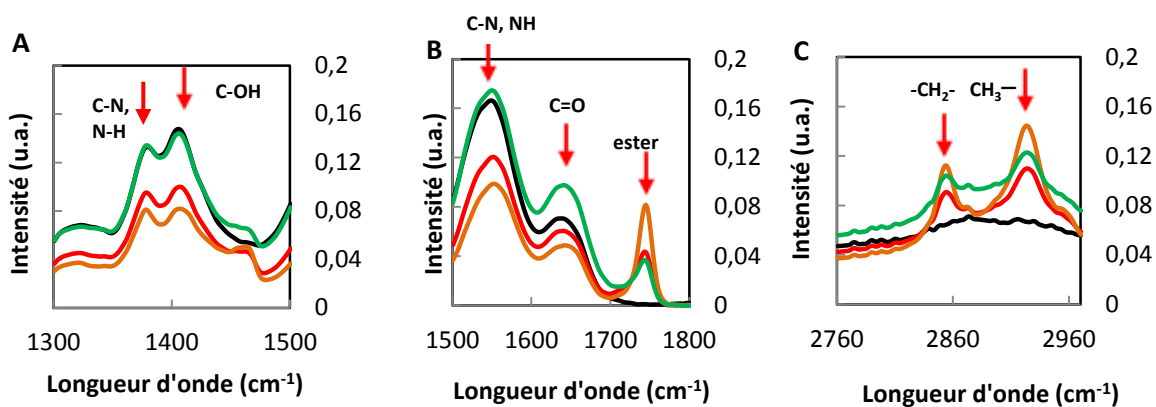
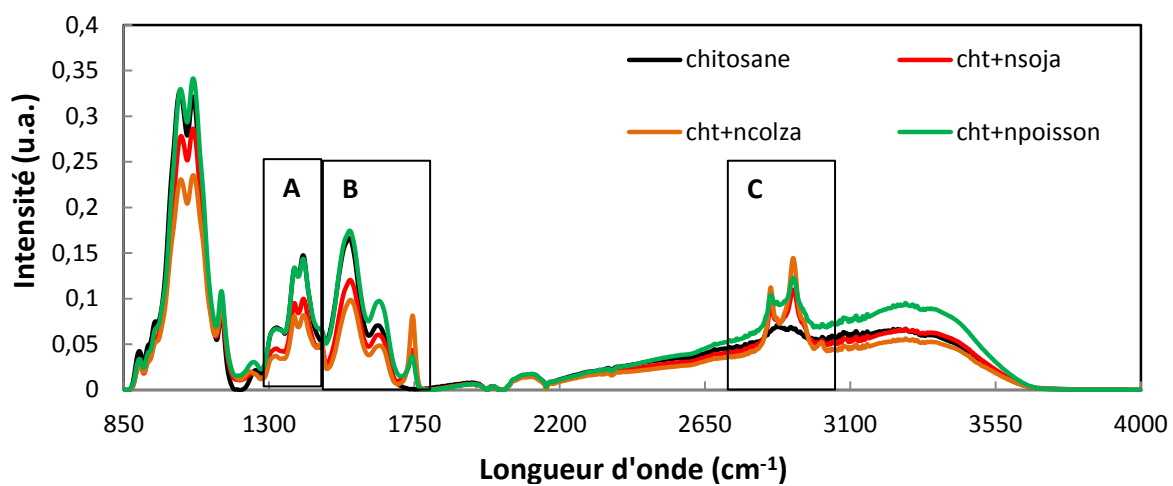


Figure III- 6 : Spectres FTIR-ATR des films de chitosane et des films de chitosane mélangé aux nanoliposomes.

Aucune nouvelle liaison n'est, a priori, pas créée lors de l'ajout de nanoliposomes dans du chitosane.

L'échelle de longueur d'onde est entre 850 cm^{-1} et 4000 cm^{-1} .

Groupes identifiée	Fréquence de référence (cm ⁻¹)	Chitosane	Cht+nsoja	Cht+ncolza	Cht+nсаumon
C-N	1090-1020	1014	1034	1009	1017
v (C-O-C)	1150-1050	1069	1050	1065	1074
C-H/C-C	1225-950/1350-1000	1145	1143	1144	1155
Amide III (C-N, N-H)	1390-1325	1374	1374	1380	1374
Alcool tertiaire ¹⁵	1410-1310	1396	1391	1412	1368
Amide II (C-N, N-H)	1550-1530	1529	1533	1534	1531
Amide I (C=O)	1650-1590	1619	1619	1627	1660
Ester ¹⁶	1735-1750	-	1731	1738	1730
Méthylène	2865-2845				
Symétrie tronçon (-CH ₂ -)		2879	2868	2848	2844
Méthyle tronçon (CH ₃ -)	2900-2880	2896	2912	2916	2911

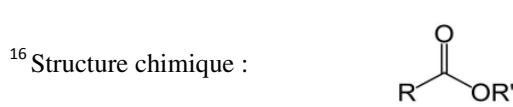
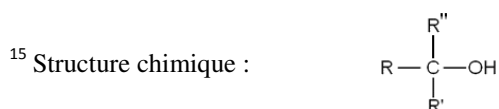
Tableau III- 10 : Groupes actifs en infra rouge dans les films minces de chitosane et de chitosane mélangé aux nanoliposomes.

Les fréquences de groupes ont été retrouvées via les références (Bhattarai *et al.*, 2006; Coates, 2000; Fernandes *et al.*, 2011).

La détermination du degré déacétylation DD

La détermination du degré déacétylation DD des films de chitosane et des films mélangés aux nanoliposomes s'effectue à partir des spectres FTIR-ATR en utilisant le formule de (Brugnerotto *et al.*, 2001; Domard and Rinaudo, 1983; Miya *et al.*, 1980) (Tableau III-11).

Une diminution de DD calculé par la formule II-13 a été observée pour les films de chitosane mélangé aux nanoliposomes. En revanche, une augmentation de DD calculé par les



formules II-12 et II-14 a été observé pour les films de chitosane mélangé aux nanoliposomes. C'est parce que l'ajout des nanoliposomes introduisent plus de quantité de CH₂ et CH₃, l'intensité de CH₂ et CH₃ augmente aux pics A₂₈₆₇ et A₂₈₇₈ (Figure III-6 C). Cela peut-être influence le calcul par les formules II-12 et II-14. Par voie de conséquence, la formule II-13 est mieux adaptée dans notre cas car l'intensité de l'amide III (C-N, N-H) et de l'alcool tertiaire (C-OH) aux pics A₁₃₂₀ et A₁₄₂₀ restent les mêmes (Figure III-6 A).

	Formule II-12	Formule II-13	Formule II-14
Chitosane	A ₁₆₅₅ =0,020 A ₂₈₇₈ =0,061 DD = 75,3	A ₁₃₂₀ =0,016 A ₁₄₂₀ =0,040 DD = 88,5	A ₁₆₅₅ =0,020 A ₂₈₆₇ =0,060 DD = 74,9
Cht+nsoja	A ₁₆₅₅ =0,028 A ₂₈₇₈ =0,11 DD = 80,9	A ₁₃₂₀ =0,015 A ₁₄₂₀ =0,025 DD = 82,1	A ₁₆₅₅ =0,028 A ₂₈₆₇ =0,090 DD = 75,7
Cht+ncolza	A ₁₆₅₅ =0,024 A ₂₈₇₈ =0,142 DD = 87,3	A ₁₃₂₀ =0,012 A ₁₄₂₀ =0,015 DD = 75,7	A ₁₆₅₅ =0,024 A ₂₈₆₇ =0,112 DD = 83,9
Cht+nsaumon	A ₁₆₅₅ =0,024 A ₂₈₇₈ =0,142 DD = 87,3	A ₁₃₂₀ =0,012 A ₁₄₂₀ =0,021 DD = 83,0	A ₁₆₅₅ =0,024 A ₂₈₆₇ =0,112 DD = 83,9

Tableau III- 11 : DD estimé en utilisant la formule de Domard and Rinaudo, (1983) (Formule II-12), de Brugnerotto *et al.* (2001) (Formule II-13), et de Miya *et al.*, (1980) (Formule II-14).

« A_x » indique l'intensité du pic à longueur d'onde x.

Le Tableau III-12 A et B présentent l'énergie de liaison E_L en eV, la largeur à mi-hauteur $FWHM$ en eV, les pourcentages atomiques de films de chitosane et de chitosane mélangé aux nanoliposomes déterminés par XPS. La région O1s et N1s de cht+nsaumon est plus importante que les autres films.

La présence de phosphate est due à la présence de l'acide phosphorique, qui se trouve dans la tête polaire des phospholipides.

L'analyse de la région C1s révèle quatre composantes pour le film de chitosane seul (Tableau III-12 A), cht+nsoja, et cht+ncolza (Tableau III-12 B): C1s C-C/C-H, C1s b, C1s C-O, C1s O-C=C. Au contraire, le film de cht+nsaumon (Tableau III-12 B) ne présente pas de pic C1s b, mais seulement un pic de C1s C=O qui se situe à 287,5 eV. La présence de C1s C-O a montré une orientation de groupe C-OH de la surface vers l'intérieur du film mince. L'augmentation de pourcentage de C-O est le responsable d'une augmentation hydrophobicité et l'énergie de surface de films (Wang *et al.*, 2009).

Ces résultats seront corrélés par la suite à la mesure de mouillabilité des films.

A)

Pics de cœur	Chitosane seul			Cht+nsoja			Cht+ncolza			Cht+nsaumon		
	E_L	(FWHM)	%	E_L	(FWHM)	%	E_L	(FWHM)	%	E_L	(FWHM)	%
F1s	-	-	-	-	-	-	-	-	-	689,1	(1,6)	1,0
O1s	533,1	(1,7)	7,1	532,5	(2,2)	13,8	532,5	(2,4)	10,5	532,5	(1,8)	21,6
N1s	399,6	(1,5)	1,5	399,6	(1,7)	0,6	399,3	(1,6)	0,6	399,3	(1,7)	4,7
C1s	291,3	(1,0)	91,4	284,7	(1,1)	85,1	284,7	(1,1)	88,2	284,6	(1,4)	72,5
P2p	-	-	-	133,4	(1,7)	0,55	133,3	(1,8)	0,5	133,1	(1,7)	0,3

B)

C1s	Chitosane seul			Cht+nsoja			Cht+ncolza			Cht+nsaumon		
	E_L	(FWHM)	%	E_L	(FWHM)	%	E_L	(FWHM)	%	E_L	(FWHM)	%
C1s C-C-C-H	284,6	(0,8)	64,0	284,6	(0,9)	53,0	284,6	(0,8)	43,3	284,6	(1,1)	37,6
C1s b	285,1	(0,9)	16,4	285,2	(0,9)	14,5	285,1	(0,9)	30,2	-	-	-
C1s C-O	286,6	(1,2)	9,5	286,4	(1,6)	14,7	286,4	(1,7)	12,2	286,1	(1,2)	24,9
C1s C=O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	287,5	(1,2)	6,9
C1s O-C=C	288,2	(1,0)	1,6	289,0	(1,0)	2,9	289,1	(0,9)	2,5	288,7	(1,2)	3,1

Tableau III- 12 : Table de composition XPS des films de chitosane et de mélangé avec des nanoliposomes.

Energie de liaison E_L en eV ; largeur à mi-hauteur $FWHM$ en eV entre parenthèses ; pourcentages atomiques.

3.3.4. Mouillabilité et énergie de surface

La mouillabilité, évaluée par la mesure de l'angle de contact et par la détermination de l'énergie de surface (totale, composante polaire et composante dispersive) par la méthode graphique d'Owens-Wendt (qui habituellement est utilisée pour des solides à faible énergie de surface comme les polymères), est améliorée en présence de nanoliposomes (Tableau III-13). Quelle que soit l'origine des nanoliposomes, l'angle de contact (l'énergie de surface totale) des films contenant des nanoliposomes est plus petit (grand) que celui des films de chitosan seul.

Parmi tous les films, ceux contenant des nanoliposomes de colza ou de saumon présentent le plus faible angle de contact. La composante non dispersive augmente avec l'incorporation de nanoliposomes et, en même temps, la composante dispersive est sensiblement du même ordre de grandeur quels que soient les films. La diminution de l'angle de contact est donc liée à l'augmentation de la composante polaire de l'énergie de surface.

Le Tableau III-13 présente les moyennes de la valeur des énergies de surface réalisées sur 9 mesures et de composante polaire et dispersive sur les films minces de chitosane et de chitosane mélangés aux nanoliposomes.

Films minces	Angle de contact moyenne (°)		Composante polaire γ^p (mJ/m ²)	Dispersive γ^d (mJ/m ²)
	Diiodométhane	L'eau		
Chitosane	59±2	101±2	1±0,4	30±0,8
Cht+nsoja	61±2	82±2	16±0,4	30±0,5
Cht+ncolza	48±2	68±1	58±4,3	23±0,3
Cht+nsaumon	55±1	64±2	50±2,0	31±0,4

Tableau III- 13 : Moyennes d'énergie de surface, de composante polaire et dispersive sur les films minces de chitosane et de chitosane mélangés aux nanoliposomes.

L'ajout de nanoliposomes à base de lécithine de saumon dans le chitosane est plus efficace pour diminuer l'angle de contact des films. Ceci est certainement relié à la proportion de lipides polaires (une partie des classes de lipides) contenu dans la lécithine de saumon et à sa variété en acides gras polyinsaturés (EPA et DHA).

3.3.5. Propriétés viscoélastiques et températures de relaxation

La Figure III-7 montrent l'évolution du module de conservation (E') et du facteur de perte (tan δ) déterminés par DMTA en fonction de la température à 10 Hz. Une large gamme de température a été utilisée afin de couvrir toute la gamme de relaxation trouvée dans la littérature (Mucha and Pawlak, 2005; Neto *et al.*, 2005; Quijada-Garrido *et al.*, 2007). Il a été observé que, à la fin de chaque analyse, les échantillons ont présenté une coloration jaune foncé indiquant que le chauffage a provoqué la dégradation de films minces.

Le module de conservation des films diminue avec l'incorporation de nanoliposomes dans le chitosane (Figure III-7 A). Les films chitosane/nanoliposomes de colza possède la plus faible valeur de E' jusqu'à une température de l'ordre de 20°C.

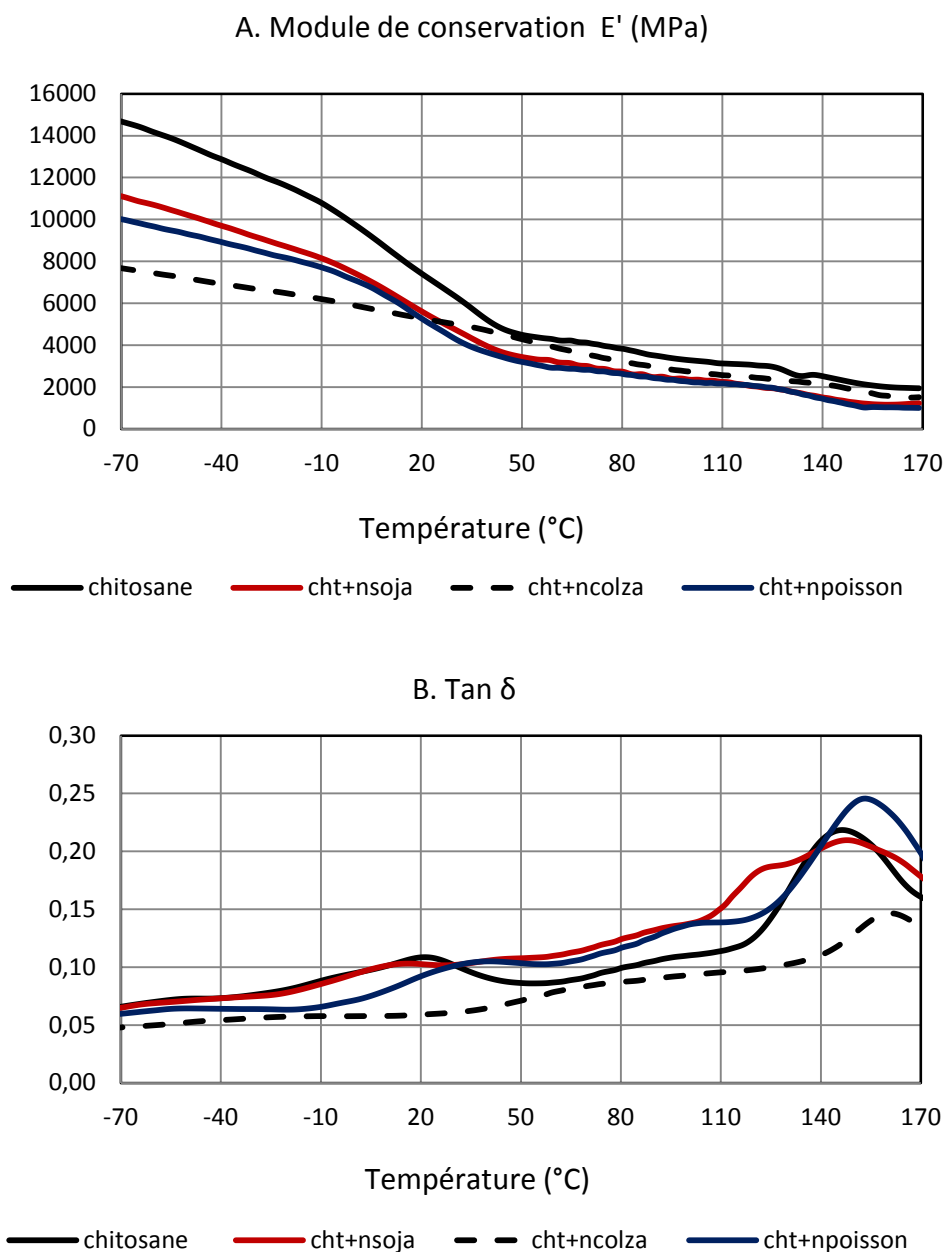


Figure III- 7 : Module de conservation (A) et facteur de perte tan δ (B) pour le chitosane, pour les films de chitosane mélangé aux nanoliposomes à la fréquence de 10 Hz.

Les modules d'Young (E) des films de chitosane seul et des films chitosane/nanoliposomes calculés à trois températures ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) en utilisant la relation classique:

$$E^2 = E'^2 + E''^2 \quad \text{Formule III - 1}$$

sont indiqués dans le Tableau III-14. E'' est le module de perte, calculé en utilisant la relation :

$$\tan \delta = E''/E' \quad \text{Formule III - 2}$$

Les résultats montrent que l'addition de nanoliposomes induit une diminution du module d'Young macroscopique des films (par rapport au film de chitosane seul). Les écarts des modules d'Young (entre le chitosane et les films chitosane/nanoliposomes) sont plus importants à hautes températures (de 25 % à 50 %) qu'à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (de 13 % à 24 %). Par ailleurs pour la gamme de température correspondant à des utilisations en tant que matrice de support, les nanoliposomes semblent stabiliser le module d'Young (à l'exception des nanoliposomes de soja).

	$T_g \equiv T_{\alpha}$	T_{β}	Module d'Young (GPa)		
			$-18\text{ }^{\circ}\text{C}$	$25\text{ }^{\circ}\text{C}$	$37\text{ }^{\circ}\text{C}$
Chitosane seul	143	91	11,5	6,9	5,5
Chitosane/nsoja	146	85	8,7	5,2	4,2
Chitosane/ncolza	157	60	6,4	5,1	4,8
Chitosane/nsaumon	152	101	8,1	4,8	4,8

Tableau III- 14 : Températures de relaxations (T_{α} et T_{β}) du chitosane et des films chitosane/nanoliposomes à 10Hz et module de Young des films de chitosane et chitosane mélangé aux nanoliposomes à trois températures ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $37\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Les températures de relaxation des films de chitosane seul et de chitosane mélangé aux nanoliposomes ont aussi été évaluées (Tableau III-14) et comparées à celles trouvées dans la littérature (Zhang *et al.*, 2012).

A titre d'illustration, seuls les résultats pour les films de chitosane sont commentés. Trois températures de relaxations pouvaient être distinguées sur la Fig. III-8 b à $19\text{ }^{\circ}\text{C}$, $91\text{ }^{\circ}\text{C}$

et 143 ° C. À 143 ° C, il s'agit de la température de relaxation α , associée à un maximum de $\tan(\delta)$, qui correspond à T_g . A titre de comparaison, Mucha et Pawlak (2005) ont indiqué une T_g du chitosane qui diminuait avec l'augmentation de DD (Mucha and Pawlak, 2005). Ils ont trouvé que T_g pouvait varier de 156 ° C à 170 ° C pour un film de chitosane seul avec un DD de 59 % à 86 %. De même, Lazaridou et Biliaderis (2002) et Quijada-Garrido *et al* (2007) ont indiqué que la T_g était comprise entre 85 ° C et 95 ° C pour un DD d'environ 90 % (Lazaridou and Biliaderis, 2002; Quijada-Garrido *et al.*, 2007). Ainsi, nous pouvons préciser le DD du chitosane utilisé dans ce travail. Celui-ci est d'environ 86 % - 90 % ($T_g = 143$ ° C).

La deuxième température de relaxation intervient vers les 91 ° C et peut être considéré comme une relaxation β due à la présence de groupes N-acétamide dans le chitosane comme proposé par Wan *et al.* (2009). Ces derniers ont trouvé une température de relaxation β à 102 ° C pour un DD de 83 % d'un chitosane seul, en bon accord aussi avec nos résultats.

La troisième température de relaxation intervient vers 19 ° C et a été attribuée à une relaxation γ en raison de la présence des phospholipides.

L'addition des nanoliposomes dans les films de chitosane modifie T_g . L'ajout de nanoliposomes de colza et de saumon respectivement déplace T_g à 152 ° C et à 157 ° C, L'ajout de nanoliposomes de soja n'a que peu d'effet sur T_g , avec une température de 146 ° C. Les films de chitosane/ nanoliposomes de colza présentent un effet visqueux moins marqué ($\tan \delta$) que les autres films. Étant donné qu'aucune nouvelle liaison n'a été observée par exemple en FTIR-ATR (illustré sur la Figure III-6), ces décalages pourraient être attribués à une agglomération au sein de la matrice des nanoliposomes.

3.3.6. Morphologies, topologies & propriétés mécaniques

L'incorporation de nanoliposomes de lécithine de saumon ou de colza ou de soja modifie considérablement les microstructures de surface analysées par TH-AFM. Ces modifications sont visibles sur les images hauteurs des Figures III-9.

Les films de chitosane seul (Figure III-9 A1) et les films de cht+nsaumon (Figure III-9 D1) présentent une morphologie homogène et peu rugueuse ($R_a = 3,5$ nm et $R_q = 5$ nm pour le chitosane seul et $R_a = 3$ nm et $R_q = 4$ nm pour chitosane/nanoliposomes de saumon). Les films de chitosane/nanoliposomes de soja ont un profil de rugosité de plus forte amplitude

moyenne ($R_a = 15$ nm et $R_q = 20$ nm), ce qui est dû essentiellement, à l'existence de microdomaines associés à des différences de propriétés nanomécaniques (Figure III-9 B1). Les films chitosane+ncolza ont les plus importants paramètres d'amplitude caractérisant la rugosité ($R_a = 30$ nm et $R_q = 38$ nm) (Tableau III-15).

En ce qui concerne les autres paramètres de rugosité : E_k ne varie pas de façon significative et reste toujours supérieur à 3. Seul S_k varie de 1 pour les films de chitosane seul, et de 0,3, 0,4 et 0,5 respectivement pour les films contenant des nanoliposomes de soja, de colza et de saumon. Cela indique simplement que, globalement, la forme des aspérités (E_k et S_k) est conservée, seule l'amplitude des aspérités est modifiée (Tableau III-15).

	R_a (nm)	R_q (nm)	S_k (nm)	E_k (nm)
Chitosane	4	5	1.0	5
Cht+nsoja	15	20	0.3	3
Cht+ncolza	30	38	0,4	4
Cht+nsaumon	3	4	0.5	4

Tableau III- 15 : R_a , R_q , S_k , et E_k des films de chitosane et de chitosane mélangé aux différents nanoliposomes.

Les propriétés nanomécaniques des films de chitosane et des films contenant des nanoliposomes ont été déterminées à 30 °C (température de la salle lors des expériences) par TH-AFM (mode HarmoniXTM) et des cartographies 512×512 (points×points). Elles sont présentées dans la Figure III-9 A2, B2, C2, et D2. Le module d'Young moyen (via un modèle DMT) sur la surface d'analyse est d'environ 1,3 GPa pour les films chitosane/nanoliposomes de saumon, il est quasiment équivalent aux films de chitosane (environ 1,5 GPa). L'incorporation de nanoliposomes à base de lécithine végétale induit une diminution d'environ 50 % du module d'élasticité ; celui-ci est d'environ 0,6 GPa pour les films chitosane+nsoja et d'environ 0,9 GPa pour les films chitosane+ncolza. De plus, les films chitosane+nsaumon et chitosane+nsoja présentent des hétérogénéités mécaniques.

Les modules de Young obtenus par TH-AFM, sont nettement inférieurs aux valeurs obtenues par DMTA (Tableau III-14). Ceci s'explique d'une part par la fréquence utilisée en DMTA (10 Hz) alors que l'analyse en mode HarmoniXTM a été faite avec une fréquence de

flexion $\nu_f = 53$ kHz, et une fréquence de torsion $\nu_t = 951$ kHz (la constante de raideur utilisée est $k_N = 1,2$ N/m). D'autre part, la distribution en volume de nanoliposomes n'est pas prise en compte dans les mesures par TH-AFM contrairement aux analyses DMTA (effet de moyenne). Enfin, le mode de sollicitation est différent. Néanmoins les résultats DMTA et TH-AFM semblent être cohérents.

Les images d'adhésion sont également présentées dans la Figure III-9 A3, B3, C3, et D3. En général, les valeurs mesurées de la force d'adhérence (F_{adh}) de surfaces comprennent les forces de Van der Waals (F_{vdw}), les forces électrostatiques (F_e) et les forces de liaison chimique (F_B) (Lubarsky *et al.*, 2004). Les images ont montré une force inférieure à celle entre la pointe et la surface. Dans le cas de film de chitosane seul et cht+nsaumon, la force d'adhérence était respectivement supérieure à 15,5 nN et 16,4 nN. En revanche, dans le cas de film de cht+nsoja et de cht+ncolza, cette valeur était respectivement supérieure à 11,7 nN et 10,4 nN. Ceci correspond bien à la tension superficielle de la solution de chitosane et de chitosane mélangés aux nanoliposomes (Tableau III-6). Une courbe de la tension superficielle en fonction de la force d'adhérence peut-être tracé pour le chitosane mélangé aux nanoliposomes. On obtient une corrélation linéaire (Figure III-8).

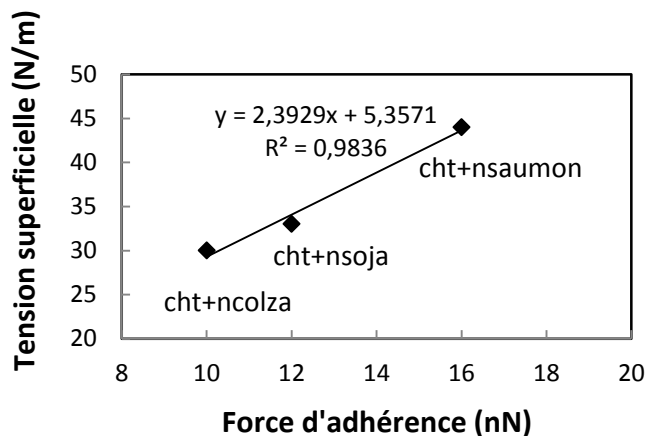


Figure III- 8 : Tension superficielle en fonction de la force d'adhérence pour le chitosane mélangé aux nanoliposomes.

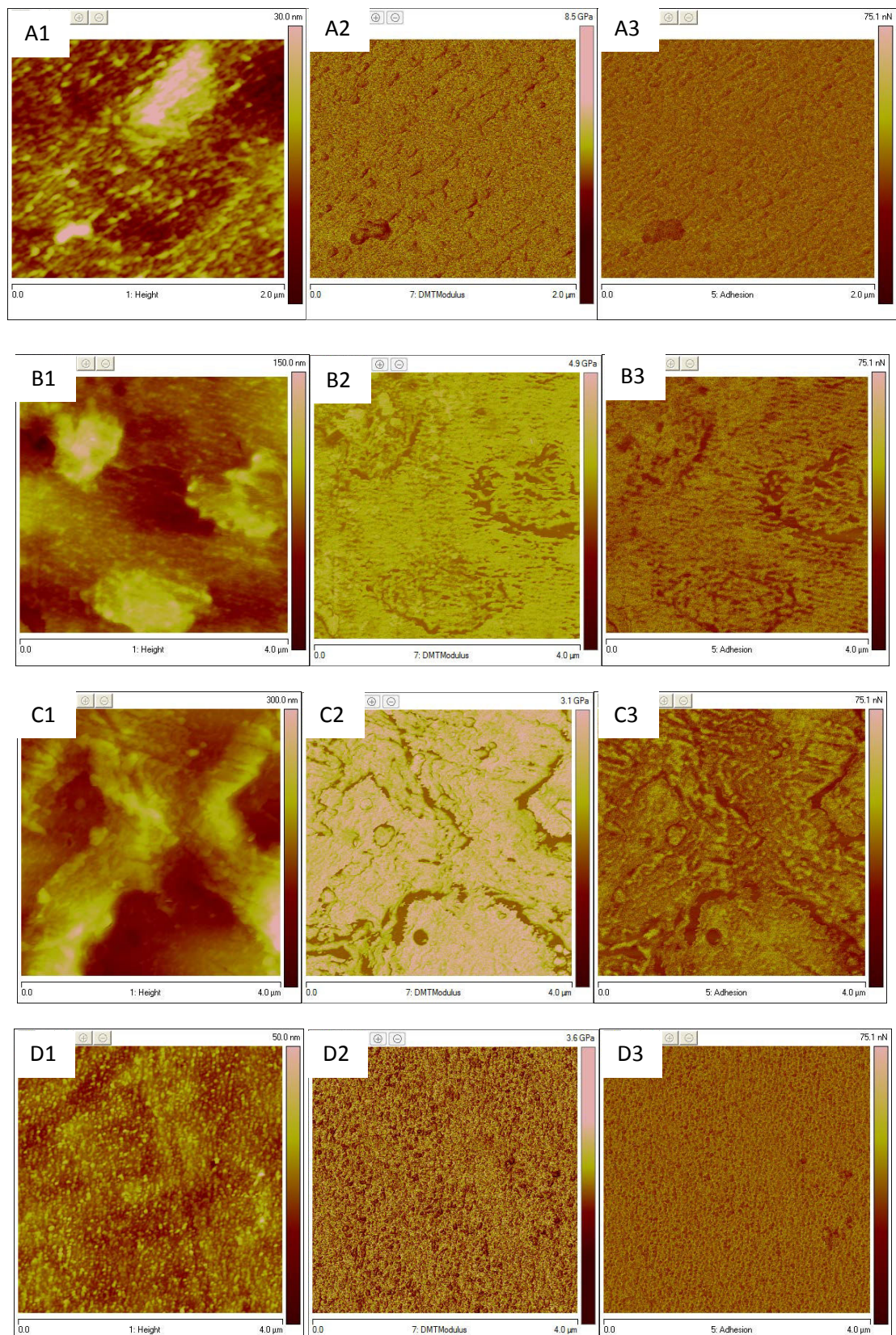


Figure III- 9 : Images hauteur, cartographie de module d'Young (modèle DMT) et image d'adhésion réalisées par TH-AFM sur des films de chitosane seul (A), de (B) chitosane/ nanoliposomes de soja, de (C) chitosane/nanoliposomes de colza et (D) chitosane/ nanoliposomes de saumon.

Conclusion

Trois films de chitosane mélangé à 10 % nanoliposomes sont préparés, caractérisés et comparés entre eux. Les résultats de différents caractéristiques physico-chimiques ont montré que la propriété mécanique, rhéologique, morphologique, structurelle et la mouillabilité de ces films a été significativement affectée par l'ajout des nanoliposomes. Lorsque les nanoliposomes se présentent, l'angle de contact de l'eau de films de chitosane contenant des nanoliposomes diminue de 100 ° jusqu'à 64 °-82 °, qui forcément liée à l'augmentation de la composante polaire de l'énergie de surface. Le taux de cristallinité du chitosane augmente de 5 % à 8 - 10 % après l'ajout des nanoliposomes. Aucune nouvelle liaison n'est, a priori, pas créée lors de l'ajout de nanoliposomes dans du chitosane. C'est une simple incorporation entre le chitosane et des nanoliposomes. En revanche, le module d'élasticité est légèrement diminue après l'ajout des nanoliposomes. Ensuite, force d'adhérence, topographie, propriétés nanomécaniques ont été déterminées par TH-AFM. Les résultats ont montré que le film de cht+nsaumon est comparable au film de chitosane seul.

- ❖ **Valorisation scientifique** : une partie du travail réalisé et décrit dans ce chapitre a été publiée dans la référence (Zhang *et al.*, 2012), qui est mis en fin de chapitre. Certains résultats ont aussi fait l'objet de communications orales et par affiches (cf : Annexe-7).

CHAPITRE IV. FONCTIONNALISATION DE LA SURFACE À L'AIDE DU TRAITEMENT PLASMA

Il s'agit d'étudier les modifications des propriétés de surface chitosane et du chitosane/nX induites par interaction plasma post-décharges. Notre but initial est de voir s'il est possible d'améliorer la mouillabilité de la surface des films de chitosane contenant des nanoliposomes par traitement plasma froid post décharge. Le pourcentage en nanoliposomes est toujours fixé à 10 % en volume.

4.1. Optimisation des paramètres physico-chimiques à l'aide d'un plan d'expériences

Avant d'analyser les résultats du plan d'expérience, une analyse de variance à un facteur a été réalisée pour déterminer si la différence de paramètre entre les différents résultats du plan d'expérience est significative, en effet, si elle ne l'est pas, alors les facteurs n'ont pas d'influence significative sur l'angle de contact. Une hypothèse nulle (H_0) a été déterminée, comme $H_0 =$ Les facteurs n'ont pas d'influence significative sur l'angle de contact.

D'après le Tableau IV-1, l'analyse de variance donne $F= 6,97$ et la table du F (24, 50) donne comme valeur de F_{critique} à 1,74. La valeur F obtenue est supérieure à la valeur de F_{critique} , on considère que l'hypothèse nulle est rejetée, donc que les différents paramètres donnent un angle de contact différent significatif, une comparaison multiple alors que nécessaire.

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	27214,4	24	1133,9	7,0	4,3E-09	1,7
A l'intérieur des groupes	8135,3	50	162,7			
Total	35349,7	74				

Tableau IV- 1 : Analyse des variances pour analyser la différence significative des angles de contact mesurés.

L'analyse des résultats du plan d'expérience donne l'équation suivante :

$$Y = 33,8 - 5,3 X_1 - 20,4 X_2 - 19,8 X_3 + 2,7 X_4 + 51,6 X_1^2 + 17,8 X_2^2 + 25,7 X_3^2 + 4,3 X_4^2 - 3,8 X_1 X_2 - 16,0 X_1 X_3 - 0,9 X_2 X_3 - 5,2 X_1 X_4 - 14,0 X_2 X_4 - 6,7 X_3 X_4$$

où X_1 représente puissance micro-onde (W), X_2 s'agit rapport des teneurs en azote dans le mélange gazeux (N_2 %), X_3 est temps de traitement (s), X_4 signifie distance de l'échantillon par rapport à la décharge (mm).

Le Tableau IV-2 montre les coefficients de régression du second ordre en utilisant les équations polynomiales quadratiques qui sont obtenues par méthode des surfaces de réponses.

Variables		Coefficients (β) sur l'angle de contact de l'eau
Intercept		33,8**
Linaire	X_1	-5,3**
	X_2	-20,4**
	X_3	-19,8**
	X_4	2,7*
Quadratique	X_1^2	51,6**
	X_2^2	17,8**
	X_3^2	25,7**
	X_4^2	4,3
Interaction	X_1X_2	-3,8
	X_1X_3	-16,0*
	X_2X_3	-0,9
	X_1X_4	-5,2
	X_2X_4	-14,0**
	X_3X_4	-6,7

*: $1\% < p. < 5\%$ **: $p. \leq 1\%$

Tableau IV- 2 : Coefficients de régression du second ordre en utilisant les équations polynomiales quadratiques qui ont obtenues par méthode des surfaces de réponses.

4.1.1. Optimisation des conditions expérimentales du traitement plasma

D'après les résultats obtenus, nous avons déterminé que le rapport des teneurs en azote dans le mélange gazeux (X_2 , $|\beta|=20,4$) et le temps de traitement (X_3 , $|\beta|=19,8$) étaient les paramètres du processus les plus influents. L'angle de contact minimum des films de chitosane (environ 20°) peut être obtenu dans les conditions suivantes: puissance micro-onde 334 W, rapport de N_2/H_2 88/12%, temps de traitement 251 s, distance de l'échantillon par rapport à la décharge 260 mm.

Les rapports de N_2/H_2 choisis pour les films de chitosane contenant des nanoliposome sont : 0/100%, 50/50%, 88/12% et 100/0%.

Tous les autres paramètres du plasma ont été fixés aux valeurs optimales que nous avons déterminées dans le cas de film de chitosane seul. C'est-à-dire la puissance micro-onde égale à 334 W, le temps de traitement est 251 s, et la distance de l'échantillon par rapport à la décharge est fixée à 260 mm.

4.1.2. Validité du plan d'expériences : l'influence du rapport N_2/H_2 sur la mouillabilité de la surface des films

Observons le Tableau IV-3, une forte diminution de l'angle de contact de films de chitosane seul et des films de chitosane mélangé aux nanoliposome de saumon est observée lorsque le pourcentage d'azote augmente. L'angle de contact diminue de 95° (0/100 %) jusqu'à 27° (88/12 %) pour les films de chitosane seul et de 94° (0/100 %) jusqu'à 41° (100/0 %) pour les films de cht+nsaumon.

Les valeurs de l'angle de contact de films de chitosane mélangé aux nanoliposome de soja se tendent de 82° vers 60° lors le pourcentage d'azote augmente. Les valeurs de l'angle de contact de films de chitosane+ncolza se tendent de 69° vers 57° avec l'augmentation du pourcentage d'azote augmente.

	N ₂ /H ₂	Angle de contact moyenne sur 9 mesures (°)	
		Avant	Après
	0/100		95±4
Chitosane seul	50/50	101±2	76±3
	88/12		27±4
	100/0		31±4
	0/100		81±9
Cht+nsoja	50/50	82±2	62±1
	88/12		62±1
	100/0		56±3
	0/100		67±4
Cht+ncolza	50/50	69±2	65±6
	88/12		57±4
	100/0		68±8
	0/100		94±2
Cht+nsaumon	50/50	64±2	65±8
	88/12		68±1
	100/0		41±9

Tableau IV- 3 : Angle de contact des films avant et après le traitement plasma.

L'énergie de surface totale des films a été déterminée graphiquement par la méthode d'Owens-Wendt (Owens and Wendt, 1969). Les résultats sont synthétisés dans le Tableau IV-4. L'énergie de surface a tendance à augmenter avec l'augmentation du pourcentage de N₂ dans le mélange gazeux du plasma.

En effet, après traitement par plasma, pour N₂/H₂ égal à 88/12 (%), nous pouvons observer que l'énergie de surface totale des films de chitosane contenant des nanoliposomes de colza a été multipliée par 6, par rapport aux films de chitosane seul. Pour les deux autres films fonctionnalisés, la plus grande variation est observée quand le rapport N₂/H₂ est égal à 100/0 (%). Dans ces conditions, l'énergie de surface totale des films contenant des

nanoliposomes de soja et de saumon est multipliée par environ 3 (toujours par rapport au film de chitosane seul).

Précisons que les énergies de surface des films de chitosane et des films de chitosane contenant des nanoliposomes de colza augmentent jusqu'à ce que le rapport N₂/H₂ soit égal à 88/12 (%) puis diminue lorsque le rapport tend vers 100/0 (%).

Echantillons	Avant le traitement plasma			Après le traitement plasma			
	Energie totale γ^T (mJ/m ²)	Composante polaire γ^p (mJ/m ²)	Composante dispersion γ^d (mJ/m ²)	Rapport N ₂ /H ₂	Energie totale γ^T (mJ/m ²)	Composante polaire γ^p (mJ/m ²)	Composante dispersion γ^d (mJ/m ²)
Chitosane seul	31±1	1±0	30±4	0/100	37±2	4±3	34±1
				50/50	60±6	22±5	39±1
				88/12	175±9	145±9	31±1
				100/0	152±1	116±2	34±1
Cht+nsoja	46±1	16±1	30±2	0/100	66±6	36±7	30±1
				50/50	107±13	76±13	31±1
				88/12	93±6	63±7	30±1
				100/0	105±10	74±9	30±1
Cht+ncolza	81±4	58±4	23±5	0/100	78±11	43±11	34±2
				50/50	82±16	49±14	33±2
				88/12	99±13	64±13	35±1
				100/0	83±19	50±19	33±2
Cht+nsaumon	82±2	51±2	31±4	0/100	37±2	5±2	32±1
				50/50	84±24	54±23	30±1
				88/12	76±4	42±4	34±1
				100/0	163±2	133±2	30±1

Tableau IV- 4 : Energies de surface avant et après traitement plasma pour les films de chitosane et les films de chitosane mélangé aux nanoliposomes.

Avant traitement plasma, les films contenant des nanoliposomes de colza ou de saumons présentent une énergie de surface totale beaucoup plus importante que les deux autres films. Mais après les traitements plasmas (quel que soit le rapport N_2/H_2) la composante dispersive de l'énergie de surface des films n'évolue quasiment pas. Nous pouvons en conclure que la présence de lipides polaires, surtout les acides gras polyinsaturés augmente la composante polaire de l'énergie de surface et donc l'énergie de surface totale.

Par ailleurs, nous observons que quel que soit le traitement plasma, l'amélioration de la mouillabilité correspond à une forte augmentation de la composante polaire. Cela signifie que le plasma greffe probablement des groupements polaires à la surface (amine par exemple), ce qui améliore la mouillabilité. Ainsi, une diminution de l'angle de contact peut être mesurée et, en conséquence, une plus haute énergie de surface est déterminée. Nous confirmons ainsi les travaux de (König *et al.*, 2002; Morra *et al.*, 1989; Vesel and Mozetic, 2012), montrant que les traitements plasma peuvent être utilisés comme une méthode efficace afin d'augmenter l'énergie de surface des polymères et dans notre cas des polysaccharides tel que le chitosane seul.

Donc, la validation du plan d'expérience est faite. Le rapport de N_2/H_2 optimisé pour les films de chitosane seul et de chitosane contenant nanoliposomes de colza est de 100/0 %. Ce rapport pour les films de chitosane contenant des nanoliposomes de soja et de saumon est de 88/12 %. Les autres paramètres restent identiques entre ces quatre systèmes. La puissance micro-onde égale à 334 W, le temps de traitement est 251 s, et la distance de l'échantillon par rapport à la décharge est fixée à 260 mm.

4.1.3. Limite d'utilisation : son caractère transitoire

Par ailleurs, nous avons effectué, préalablement à l'étude, un suivi de l'angle de contact au cours du temps, en conservant les échantillons à 4°C. La Figure IV-1 illustre les résultats obtenus pour le film de chitosane seul traité avec un rapport de $N_2/H_2=100/0$ %. Un effet de vieillissement a été observé au bout de 7 jours.

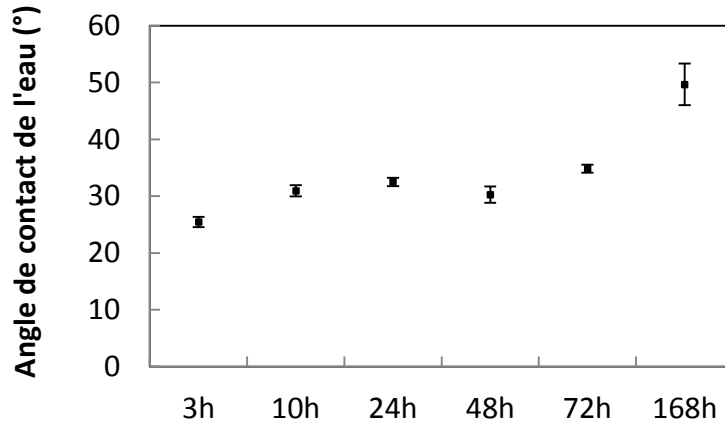


Figure IV- 1 : Suivi de l'angle de contact de film de chitosane seul au cours du temps de conservation à 4 °C.

Traitement plasma condition : puissance micro-onde 334 W, rapport de $N_2/H_2 = 100/0$ %, temps de traitement 251 s, distance de l'échantillon par rapport à la décharge 260 mm.

D'après l'étude de (Chichti *et al.*, 2013), pour les échantillons traités par plasma et conservés à température ambiante, l'angle de contact re-augmente après 24 h de conservation à 4 °C, appelé « vieillissement ». En revanche, cette reprise n'est pas complète même si l'échantillon est conservé pendant 7 jours. En plus, l'angle de contact ne varie plus au cours du temps et se stabilise à 50 °, soit la moitié de la valeur de l'angle de contact du chitosane seul non traité (101 °). D'après (Safinia *et al.*, 2005; Temmerman *et al.*, 2005), cet effet de vieillissement est causé par une relaxation dans la structure du polymère et l'orientation des groupes polaires de la surface vers l'intérieur afin de réduire la tension interfaciale. La dissipation des groupements actifs dépend du milieu de stockage, le matériau traité, et aussi le mélange gazeux du traitement (König *et al.*, 2002).

Afin d'étudier les modifications de surface induites par les traitements plasma, des analyses physiques, chimiques et mécaniques ont été effectuées. Pour illustrer ces résultats, les analyses par XPS et IC-AFM sont présentées ainsi que le suivi de la perte de masse des échantillons.

4.2. Influence du rapport volumique N₂/H₂ sur : perte de masse, composition chimique de surface (analyse par XPS), morphologie, et topologie de surface (analyse par IC-AFM)

4.2.1. Perte de masse

Différents rapports de N₂/H₂ ont une influence totalement variable sur la perte de masse des films (Tableau IV-5).

Echantillons	N ₂ /H ₂	Variation de masse (%)
		$(m-m_0)/m_0$ (%)
Chitosane seul	0/100	0,13±0,09
	50/50	-1,20±0,17
	88/12	-1,05±0,52
	100/0	-1,96±0,40
Cht+nsoja	0/100	0,91±0,05
	50/50	-0,41±0,05
	88/12	0,88±0,16
	100/0	2,81±0,32
Cht+ncolza	0/100	0,98±0,04
	50/50	-0,58±0,14
	88/12	0,94±0,17
	100/0	0,32±0,10
Cht+nsaumon	0/100	0,96±0,12
	50/50	-0,52±0,26
	88/12	1,10±0,12
	100/0	0,58±0,32

Tableau IV- 5 : Variation de masse en masse % avant et après le traitement plasma.

Les résultats présentés Tableau IV-5 montrent que plus on ajoute d'azote, plus l'échantillon de chitosane seul perd de sa masse. L'azote semble être responsable de la gravure de la surface de films de chitosane seul.

Les films de chitosane contenant des nanoliposomes perdent de la masse jusqu'à un rapport N₂/H₂ est de 50/50 % puis regagnent de la masse lorsque le pourcentage de N₂ augment. Un phénomène de fonctionnalisation par greffage de groupements chimiques en même temps que la gravure peut donc être responsable de cette évolution.

4.2.2. Détermination des groupements chimiques par XPS

L'analyse par XPS nous permet d'avoir une idée sur les modifications de la chimie de l'extrême surface suite au traitement plasma (Gray *et al.*, 2003). Cette extrême surface s'étend dans notre cas sur une profondeur d'environ 10 nm (König *et al.*, 2002).

Pour l'analyse des résultats, nous prenons un exemple de convolution de pic de film du chitosane seul (Figure IV-2):

Le pic O1s a été décomposé en deux pics attribués à la liaison O=C et aux fonctions O-C, O-H (Figure IV-2 b).

Le pic C1s a été décomposé en trois pics distincts correspondants aux liaisons C-(C, H), C-O et O-C = O (Figure IV-2 c).

Le pic N1s a été décomposé en 2 pics correspondant aux liaisons C-(NH, NH₂) et C-NH₃ (Figure IV-2 d).

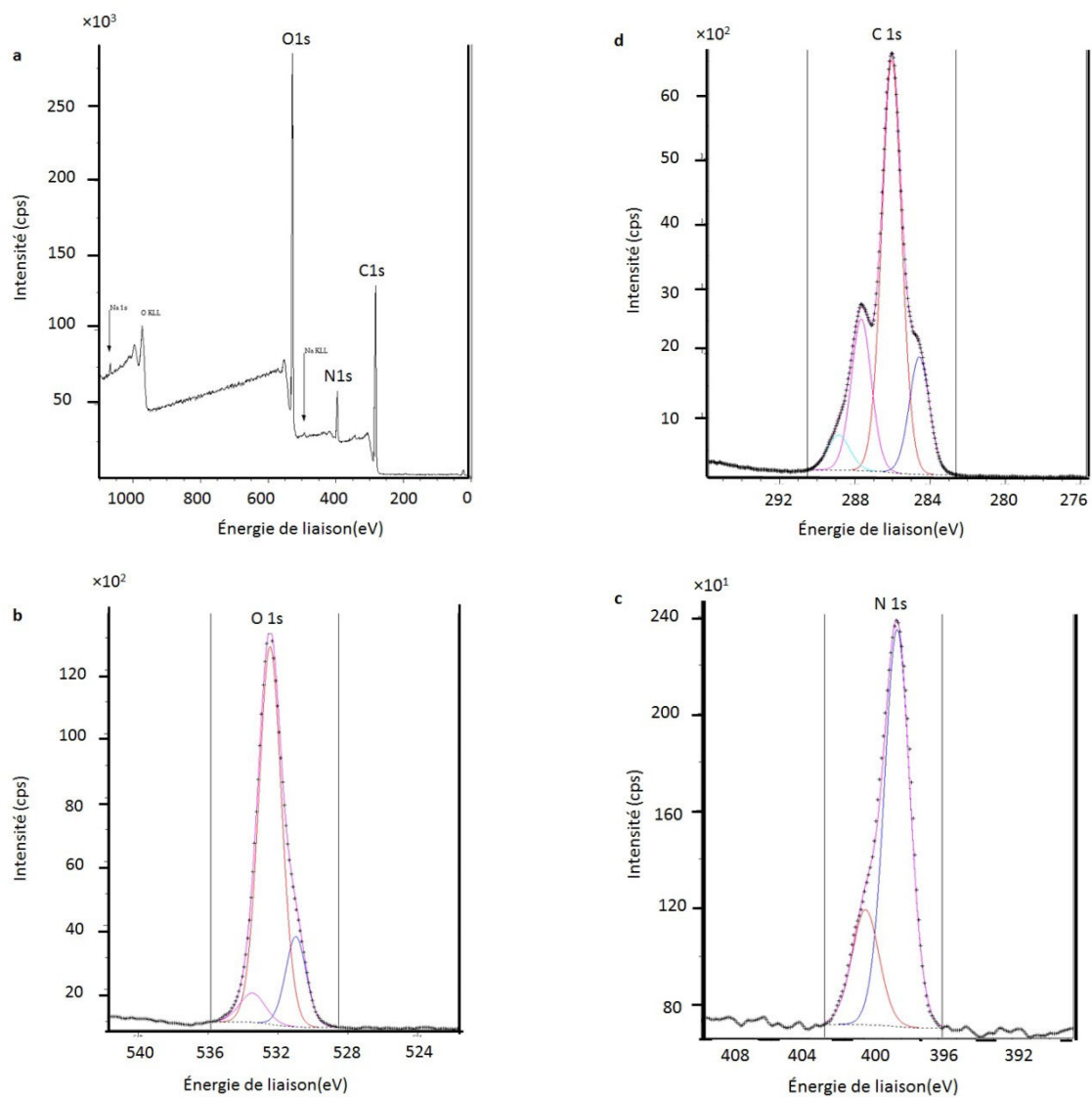


Figure IV- 2 : Exemple de déconvolution de pic de film du chitosane seul.

Par déconvolution des pics, il est possible de déterminer les proportions de chacun des groupements qui composent matériau. Le pourcentage d'atome de l'ensemble du matériau a été calculé par la proportion de C1s multiplié par le pourcentage de composante.

La proportion de C1s des films de chitosane reste quasiment inchangée pour les quatre traitements à part une augmentation pour le traitement de $N_2/H_2=100/0$ % (Tableau IV-6 a). Les films de chitosane seul ont une forte contribution du pic C1s. Le pourcentage en oxygène, en azote et en carbone en surface, varient très nettement en fonction de l'ajout de nanoliposomes de soja, de colza ou de saumon mais varient aussi en fonction du rapport N_2/H_2 (Tableau IV-7 a). La proportion de C1s de cht+nsaumon est plus petite parmi les films de chitosane mélangé aux nanoliposomes.

Dans le cas de films de chitosane seul, la proportion de C-O augmente fortement après le traitement (de 10 % jusqu'à 29 - 35 %) (Tableau IV-6 b). Cela confirme une forte diminution de l'angle de contact de ces films. D'après (Wang *et al.*, 2009), C-O permet d'orienter les composés polaires vers l'intérieur de polymère, donc il est le responsable de l'hydrophobicité de surface.

Après incorporation des nanoliposomes, une augmentation de la contribution du pic O1s est aussi mise en évidence, ce qui indique une incorporation d'oxygène à la surface (Tableau IV-7 c). Cette augmentation est plus prononcée pour les nanoliposomes à base de lécithine de saumon. Par la déconvolution de pic O1s, nous avons remarqué que sous l'effet du traitement plasma, il y avait une augmentation significative des groupements O=C par rapport aux films non traités, ce qui peut être la cause de l'hydrophobicité de chitosane mélangé aux nanoliposomes.

Nous avons aussi montré que l'ajout de nanoliposomes à base de lécithine de saumon induisait une forte augmentation de la contribution polaire de l'énergie de surface (Tableau III-13). Dans le Tableau IV-7 b et c, on observe que les nanoliposomes à base de lécithine de saumon augmentent significativement le nombre de groupes fonctionnels polaires (C-O, O-C, et OH). Ainsi, en augmentant la teneur de ces groupes polaires, l'angle de contact des films de chitosane diminue et la mouillabilité augmente. Les résultats XPS sont bien corrélés aux mesures de l'angle de contact.

Pour le pic N1s, nous pouvons observer une augmentation significative des groupements C-(NH, NH_2) par rapport aux films non traités (Tableau III-12 A). Ce qui nous

laisse penser que le greffage d'azote est réussi par ce traitement, des groupements hydrophiles (NH, NH₂, etc.) à la surface du chitosane mélangé aux nanoliposomes ont bien été introduits.

Après traitement plasma, et en comparaison avec les films de chitosane seul ; les contributions des pic O1s et N1s augmentent significativement, alors la contribution du pic C1s a fortement diminuée. Les intensités des trois pics liés aux liaisons C-O, C = O et O-C = O ont augmentés, alors que les intensités des pics liées aux liaisons O-C O-H et C-(C, H) ont diminuées ; à l'exception des nanoliposomes à base de lécithine de saumon. Cela indique que certaines liaisons de surfaces des films de chitosane ont été brisées par des espèces réactives du plasma. Ces liaisons semblent créer par la suite des liaisons insaturés et instables C = O sur la surface.

Comparer aux films non traités contenant des nanoliposomes, les films traités ont des intensités de pic O1s et N1s plus importantes. Le traitement plasma a provoqué une augmentation de groupements fonctionnels C=O et C-O.

La proportion de C-O de films de chitosane mélangé aux nanoliposomes reste quasiment inchangée après le traitement, cela signifie que le groupement C-O n'est pas le responsable de l'hydrophobicité de films de chitosane mélangé aux nanoliposomes.

À partir des résultats obtenus par XPS, nous pouvons supposer que l'amélioration de la mouillabilité de chitosane seul est plutôt due à un effet mécanique de structuration causée uniquement par la gravure. Ceci est confirmé par la perte de masse.

Sous l'effet du traitement plasma, quelques groupements fonctionnels polaires sont été greffés à la surface de chitosane mélangé aux nanoliposomes. Ce qui expliquerait la légère variation observée dans le spectre O1s et le grand changement dans le spectre N1s. Cette fonctionnalisation expliquerait alors l'augmentation de l'énergie des composés polaires observés.

Un tableau résume tous les pourcentages d'atome à l'ensemble de chaque film qui se trouvent dans l'Annexe-6.

(a)

Pics de cœur	Chitosane N ₂ /H ₂ =0/100 %			Chitosane N ₂ /H ₂ =50/50 %			Chitosane N ₂ /H ₂ =88/12 %			Chitosane N ₂ /H ₂ =100/0 %		
	E _L	(FWHM)	%	E _L	(FWHM)	%	E _L	(FWHM)	%	E _L	(FWHM)	%
O1s	532,4	(1,7)	32,7	532,3	(1,9)	31,7	532,5	(1,8)	33,5	532,4	(2,0)	28,0
N1s	399,1	(1,8)	7,8	399,3	(1,9)	10,7	399,3	(2,0)	8,6	399,2	(1,8)	6,5
C1s	286,0	(1,3)	59,5	286,0	(1,5)	57,5	286,0	(1,4)	57,6	286,0	(2,6)	65,4

(b)

C1s	Chitosane N ₂ /H ₂ =0/100 %			Chitosane N ₂ /H ₂ =50/50 %			Chitosane N ₂ /H ₂ =88/12 %			Chitosane N ₂ /H ₂ =100/0 %		
	E _L	(FWHM)	%	E _L	(FWHM)	%	E _L	(FWHM)	%	E _L	(FWHM)	%
C-C/C-H	284,6	(1,2)	10,7	284,6	(1,2)	11,6	284,6	(1,2)	9,4	284,6	(1,2)	24,5
C-O	286,0	(1,2)	34,6	286,0	(1,2)	30,9	286,0	(1,2)	32,7	286,0	(1,2)	29,3
C=O	287,6	(1,2)	11,5	287,7	(1,2)	12,2	287,7	(1,2)	12,3	287,7	(1,3)	10,9
O-C=C	288,6	(1,5)	2,7	288,8	(1,2)	2,8	288,9	(1,4)	3,1	288,6	(1,6)	2,6

Tableau IV- 6 : (a) Table de composition XPS des films de chitosane seul ; (b) Déconvolution du pic C1s après le traitement plasma par différent rapport de N₂/H₂.

(a)

Pics de cœur	Cht+nsoja N ₂ /H ₂ =100/0 %			Cht+ncolza N ₂ /H ₂ =88/12 %			Cht+nsaumon N ₂ /H ₂ =100/0 %		
	E _L	(FWHM)	%	E _L	(FWHM)	%	E _L	(FWHM)	%
F1s	-	-	-	-	-	-	689,0	1,6	0,9
O1s	532,3	(2,5)	18,3	532,2	(2,6)	14,7	532,5	(2,1)	25,7
N1s	400,1	(1,9)	4,8	399,9	(1,8)	5,2	399,7	(2,1)	7,4
C1s	284,6	(1,2)	76,1	284,6	(1,2)	79,9	284,6	(2,6)	65,0
P2p	133,6	(1,6)	0,6	133,0	(1,9)	0,2	-	-	-

(b)

C1s	Cht+nsoja N ₂ /H ₂ =100/0 %			Cht+ncolza N ₂ /H ₂ =88/12 %			Cht+nsaumon N ₂ /H ₂ =100/0 %		
	E _L	(FWHM)	%	E _L	(FWHM)	%	E _L	(FWHM)	%
C-C/C-H	284,6	(1,1)	53,0	284,6	(1,1)	57,9	284,6	(1,1)	28,4
C-O	285,8	(1,5)	11,0	285,8	(1,6)	10,9	286,1	(1,2)	23,3
C=O	286,9	(1,5)	5,7	286,8	(1,6)	5,1	287,7	(1,2)	8,8
O-C=C	288,7	(1,6)	6,5	288,6	(1,7)	6,1	288,8	(1,2)	4,5

(c)

O1s	Cht+nsoja N ₂ /H ₂ =100/0 %			Cht+ncolza N ₂ /H ₂ =88/12 %			Cht+nsaumon N ₂ /H ₂ =100/0 %		
	E _L	(FWHM)	%	E _L	(FWHM)	%	E _L	(FWHM)	%
O=C	531,3	(1,6)	4,0	531,0	(1,5)	2,4	531,0	(1,4)	4,7
O-C/O-H	532,3	(1,6)	10,4	532,1	(1,6)	8,2	532,5	(1,7)	19,4
H ₂ O	533,5	(1,5)	4,0	533,3	(1,7)	4,1	533,5	(1,8)	1,6

Tableau IV- 7 : (a) Table de composition XPS des films de chitosane+nanoliposomes de soja, de colza et de saumon après le traitement plasma par différent rapport de N₂/H₂ ; (b) Déconvolution du pic C1s, (c) Déconvolution du pic O1s.

N1s	Rapport de N ₂ /H ₂ (%)	C-(NH, NH ₂)		
		<i>E_L</i>	(<i>FWHM</i>)	%
Chitosane seul	0/100	399,1	(1,5)	5,9
Chitosane seul	50/50	399,3	(1,7)	8,7
Chitosane seul	88/12	399,3	(1,6)	6,6
Chitosane seul	100/0	399,2	(1,5)	4,4
Cht+nsoja	100/0	400,0	-	4,8
Cht+nccolza	88/12	399,9	-	5,8
Cht+nsaumon	100/0	399,7	-	7,4

Tableau IV- 8 : Déconvolution du pic N1s pour films de chitosane seul et chitosane mélangé aux nanoliposomes après traitement plasma au différent rapport de N₂/H₂.

4.2.3. Topologie et mesure de la rugosité par IC-AFM

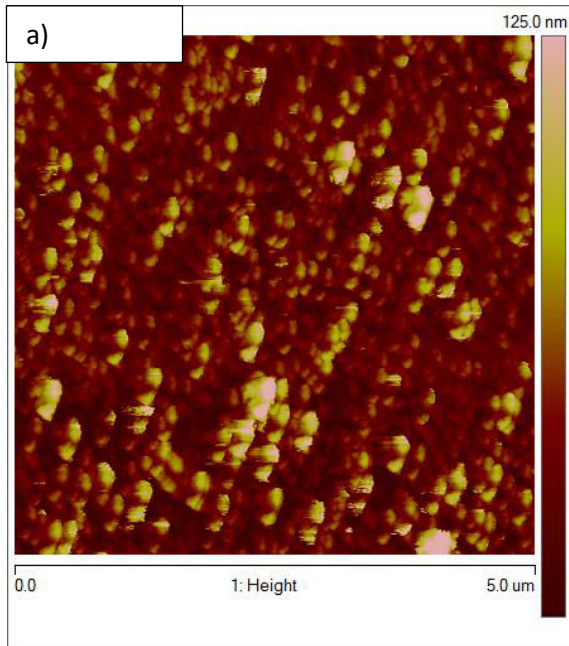
Le traitement plasma modifie la composition chimique de la surface et induit une modification de la topographie de la surface. Pour étudier cette évolution une étude par IC-AFM a été effectuée. Les images en mode 3D IC-AFM, sont présentées sur les Figures IV-3.

Ces dernières montrent une évolution différente de la topographie de surface selon la composition du mélange gazeux utilisé pour le traitement.

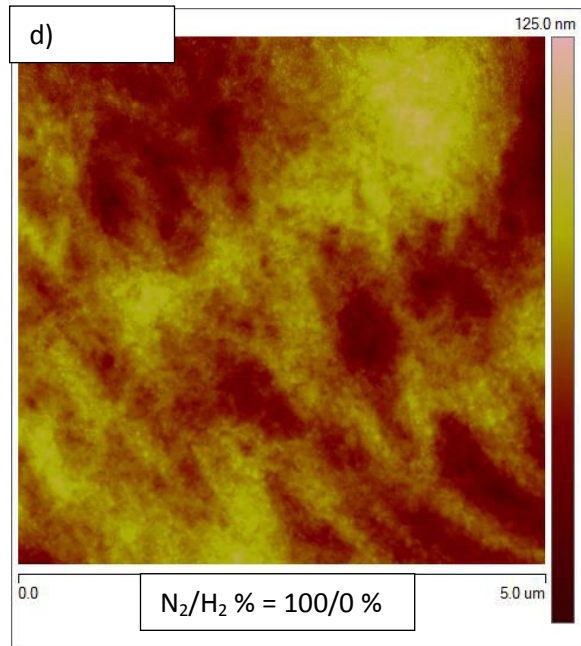
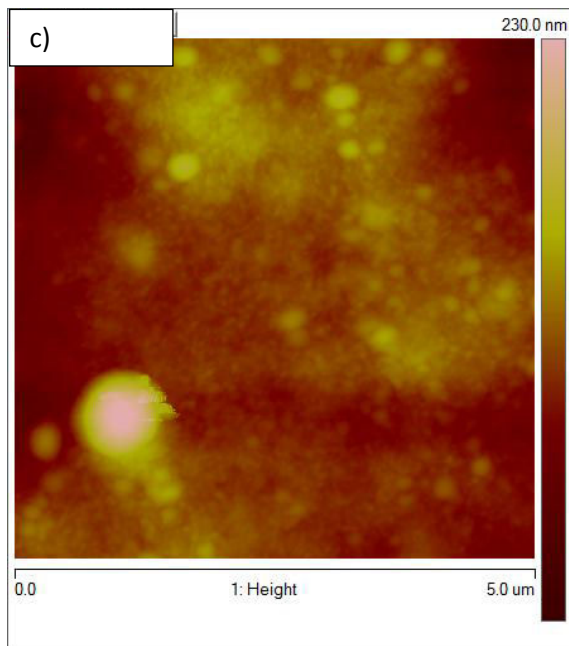
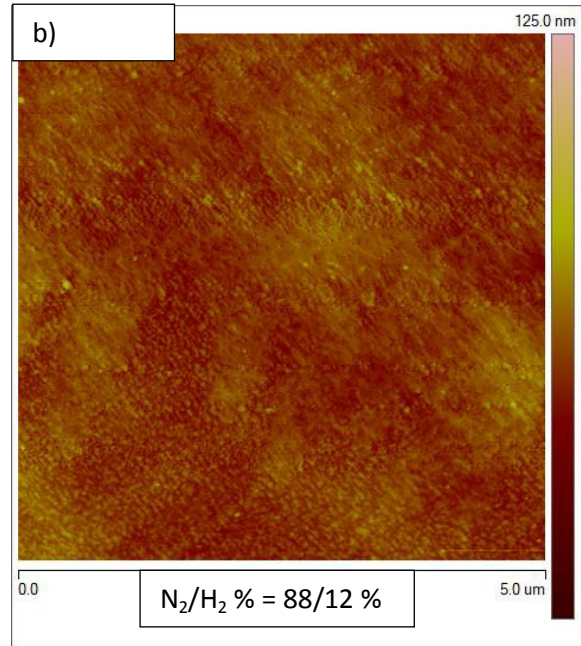
Avant le traitement, les films de chitosane seul (Figure IV-3 a) semblent plus hétérogène que les autres films (Figure IV-3 b, c, et d). Ils ont une rugosité arithmétique et quadratique moyennes plus importantes que les autres avec $R_a = 20$ nm, $R_q = 16$ nm (Tableau IV-9). Après le traitement plasma avec les conditions optimisé, $N_2/H_2=88/12$ % (Figure IV-3 b), R_a et R_q de chitosane seul diminue, cela signifie que le traitement de plasma lui permet de rétablir la structure de la surface. Cette évolution tend à confirmer que la perte de masse est plutôt due à un effet mécanique de structuration causée uniquement par la gravure.

En ce qui concerne la rugosité arithmétique et quadratique moyennes des films de chitosane+nanoliposomes, celles-ci ne varient quasiment pas après le traitement. C'est une conséquence du greffage du polymère par les espèces actives de la post-décharge, et plus particulièrement les groupements C-O et NH, NH₂ (Narushima *et al.*, 2007).

Avant le traitement



Après le traitement



Suite de la page précédente

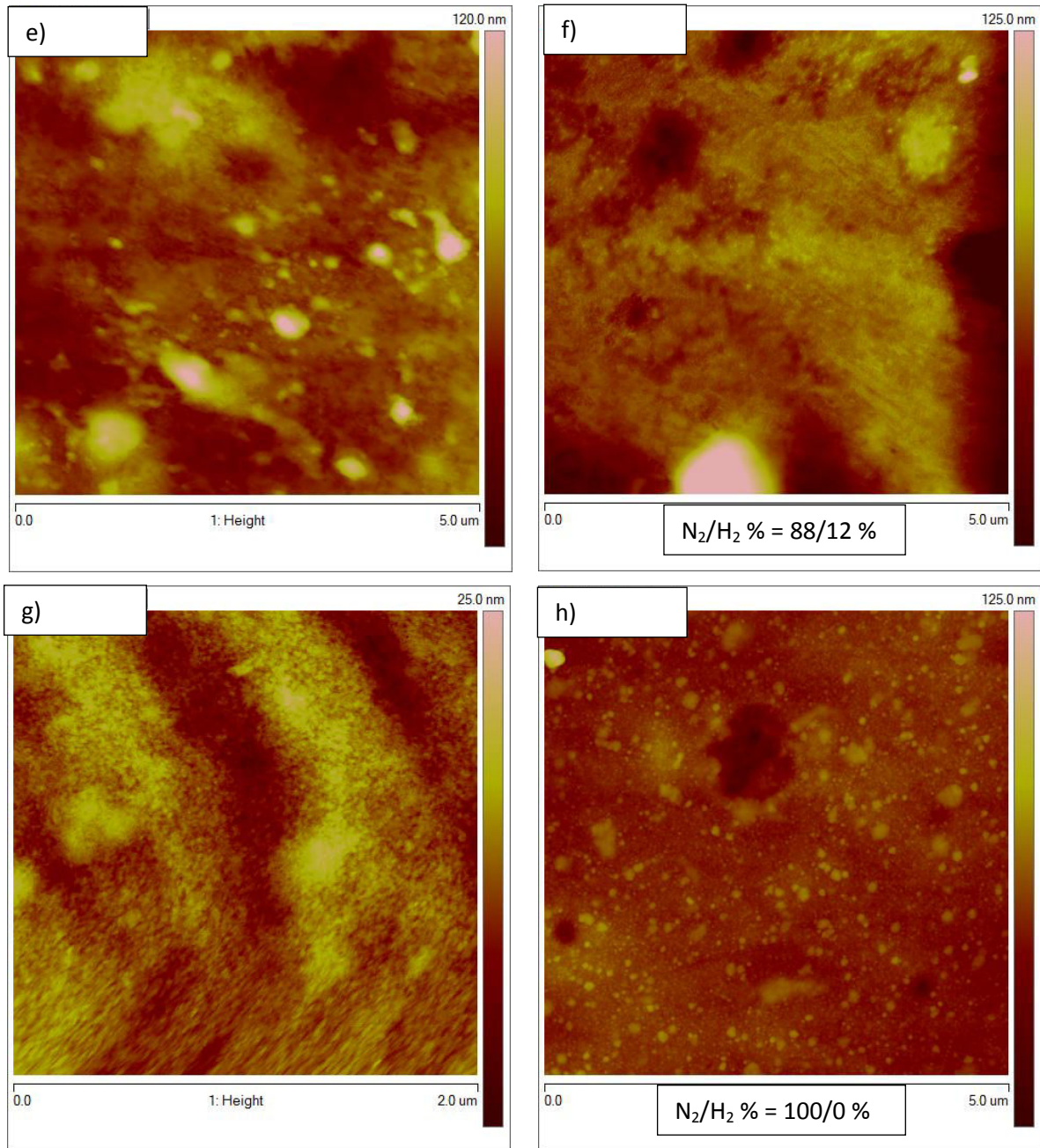


Figure IV- 3 : Images 3D AFM des films de chitosane non traité (a), traité avec $N_2/H_2=88/12$ % (b), cht+nsoja non traité (c), traité avec $N_2/H_2=100/0$ % (d), cht+ncolza non traité (e), traité avec $N_2/H_2=88/12$ % (f), cht+nsaumon non traité (g), et traité avec $N_2/H_2=100/0$ % (h). Unité en nm.

En ce qui concerne les autres paramètres de rugosité : E_k varie de façon significative et reste toujours supérieur à 3. Cela veut dire que la profile de distribution est serré, notamment pour cht+ncolza avant le traitement. Dans le cas de chitosane seul, S_k varie de 1 avant le traitement à 0,05 après le traitement, cela indique que, le profile creux diminue. Dans le cas de cht+ncolza, S_k varie de 2,2 à -0,7, cela veut dire que le profile creux devient plus plein. S_k de cht+nsoja reste quasiment la même avant et après le traitement. En revanche, seul S_k de cht+nsaumon augmente de 0,3 à 1, le profile devient plus creux après le traitement. Cela indique que, globalement, la forme des aspérités (E_k et S_k) de films de chitosane seul, de cht+nsoja, et de cht+nsaumon est variée au même temps que l'amplitude des aspérités est modifiée (Tableau IV-9).

		R_a (nm)	R_q (nm)	S_k (nm)	E_k (nm)
Avant le traitement	Chitosane	20	16	0,9	4
	Cht+nsoja	8	7	0,4	4
	Cht+ncolza	10	7	2,2	11
	Cht+nsaumon	3	2	0,3	3
Après le traitement	Chitosane	5	4	0,05	4
	Cht+nsoja	10	8	-0,3	3
	Cht+ncolza	8	6	-0,7	5
	Cht+nsaumon	5	3	1	5

Tableau IV- 9 : R_a , R_q , S_k , et E_k des films de chitosane et de chitosane mélangé aux différents nanoliposomes.

4.2.4. Discussion et interprétation

Les mesures de pertes de masse (Tableau IV-5) et le suivi de la morphologie et de la topologie par IC-AFM (Figure IV-3) nous ont permis de mettre en évidence que l'augmentation du pourcentage d'azote dans le mélange gazeux induisait une érosion et une gravure de surface plus importante dans le cas de film du chitosane seul (variation de masse en négatif).

Nous avons montré que quel que soit le traitement plasma, l'amélioration de la mouillabilité correspond à une forte augmentation de la composante polaire. La lécithine de saumon permet d'améliorer l'hydrophilicité. En augmentant le pourcentage en N_2 on diminue

la densité de radicaux libres en phase gazeuse. Ceci pourrait expliquer l'augmentation de l'énergie de composés polaires.

L'analyse XPS montre que la composition en lécithine et la composition du gaz est deux paramètres les plus influents et permet de confirmer le greffage de groupements fonctionnels sur la surface des films de chitosane. Les différences entre les nanoliposomes peuvent s'expliquer par des compositions en acides gras différents. Les nanoliposomes de soja et de colza ont le même type d'acides gras dans des proportions différentes. La lécithine de saumon a une grande influence sur la composition de la surface du fait de sa forte proportion en AGPI.

A partir des résultats obtenus, on peut conclure que le greffage des composés polaires (ex : groupes amine, C-O, COOH, -OH) dus au traitement plasma permet d'améliorer la mouillabilité en raison d'une augmentation de la quantité de composante polaire.

Conclusion

Les films de chitosane et de chitosane mélangé aux nanoliposomes ont été traités par plasma afin d'améliorer leur mouillabilité de surface. En utilisant un mélange de gaz lors que le processus du plasma, les groupes fonctionnels tels que C-O, -NH, -NH₂ sont greffés sur la surface des films pour améliorer l'énergie de surface des films. L'effet du traitement par plasma dépend de la nature du film, en particulier de la nature de nanoliposomes. Il a également fourni plus d'efficacité et plus d'avantages que l'incorporation des nanoliposomes dans les films. Cependant, la stabilité de l'effet de traitement par plasma dépend des conditions de stockage. Les liaisons hydrogène entre les groupes polaires créés par le traitement peuvent être éliminées partiellement après un temps donné, ce qui peut expliquer pourquoi de nombreux chercheurs n'ont pas réussi à trouver une meilleure mouillabilité dans leurs échantillons traités. La dissipation des groupements actifs dépend du milieu de stockage, du matériau traité, et aussi du mélange gazeux du traitement. Cet inconvénient peut limiter l'application de cette procédure dans l'ingénierie tissulaire.

- ❖ **Valorisation scientifique** : une partie du travail réalisé et décrit dans ce chapitre a été publiée dans la référence (Zhang *et al.*, 2013), qui est mis en fin de chapitre. Certains résultats ont aussi fait l'objet de communications orales et par affiches (cf : Annexe-7).

**CHAPITRE V. ÉVALUATION DE LA
BIOCOMPATIBILITÉ ET DE LA BIODÉGRABILITÉ
IN VITRO DES FILMS DE CHITOSANE SEUL ET DE
CHITOSANE MÉLANGÉ AUX NANOLIPOSOMES**

5.1. Évaluation de la biocompatibilité *in vitro*

La préparation et les produits utilisés sont présentés dans l'article « *Physical, chemical and in vitro characterization of nanoliposomes/chitosane blend scaffolds for tissue engineering* » soumis à « *Tissue engineering* », qui est mis en fin de chapitre. Les techniques expérimentales sont présentées dans le chapitre II.

5.1.1. Capacité d'absorption d'eau et vitesse de gonflement des films

D'après Cheng *et al.* (2014), le comportement de gonflement des films est essentiel pour une application dans l'ingénierie tissulaire. Car une absorption de l'eau rapide assiste l'adhésion cellulaire et la prolifération cellulaire (Cheng *et al.*, 2014). En revanche, il est toujours difficile d'obtenir une répartition uniforme des cellules à l'intérieur d'une matrice de support hydrophobe, lorsqu'elle flotte dans le milieu de culture cellulaire. Avec une matrice de support apportant une capacité appropriée d'absorption de l'eau, la pénétration du milieu physiologique et la suspension cellulaire dans la matrice de support seront plus réalisables (Zhu *et al.*, 2004). Plus le pourcentage de gonflement du matériau est élevé et plus son rapport surface/volume sera important.

Dans la Figure V-1 A, les films minces de cht+nsoja 0,5 %, cht+nsaumon 1 % et cht+nsaumon 2 % indiquent que la capacité d'absorption de l'eau est égale ou supérieure à celui des films de chitosane seul après 24 h d'incubation dans la solution PBS. Le pourcentage de gonflement de film de cht+nsaumon 0,5 % était d'environ 170 %, supérieur que les autres films. Après 7 jours d'incubation, cette variation devient stable pour tous les films minces. La Figure V-1 B montre le film de cht+nsaumon 0,5 % avant et après 24 h d'incubation dans PBS. Celui de gauche indique le film avant l'incubation, et celui de droite était après l'incubation.

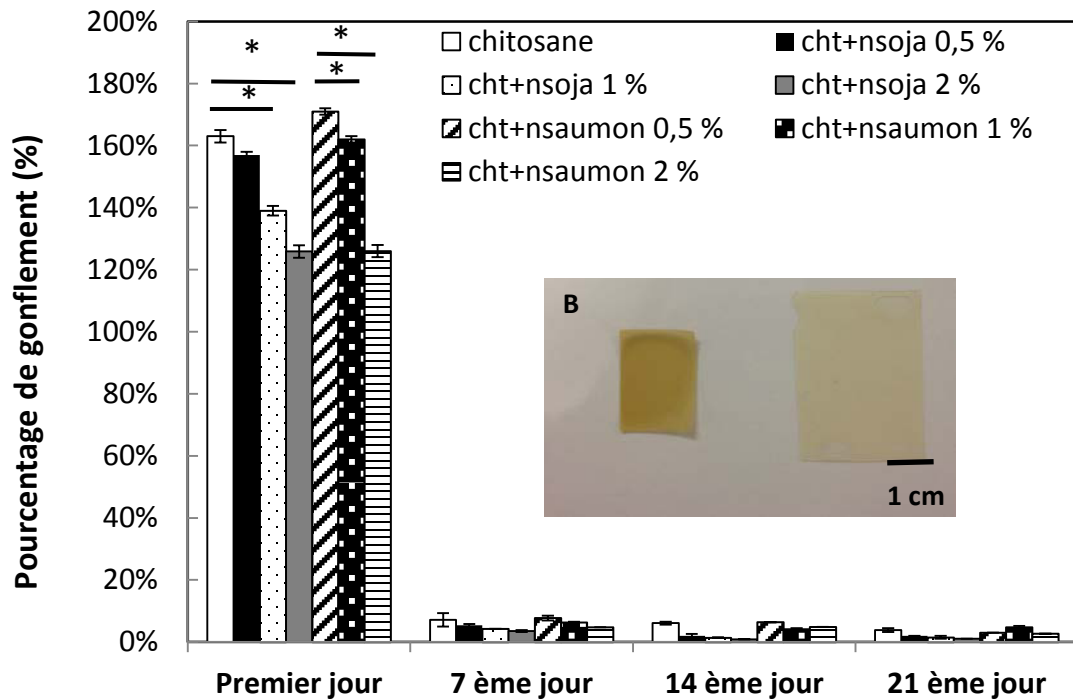


Figure V- 1 : A : Évaluation du pourcentage de gonflement des films de chitosane, et de chitosane mélangé à différentes concentrations de nanoliposomes durant 21 jours d'incubation dans PBS. B : Exemple du film de cht+nsaumon 0,5 % avant (gauche) et après 24 h (droite) d'incubation dans PBS. * significatif.

5.1.2. Faible cytotoxicité après 24 h d'ensemencement des cellules sur MEC

La cytotoxicité des films de chitosane seul, cht+nsoja et cht+nsaumon, a été évaluée au bout de 24 h après l'ensemencement des cellules. La libération de LDH par les CSMh sur le film de chitosane a été considérée comme contrôle de base. D'après une analyse statistique, il n'y a pas de différences significatives au niveau de la cytotoxicité entre le film de chitosane et le film de chitosane contenant des nanoliposomes ($p = 0,2015$). Toutes les matrices de support ont montré une bonne biocompatibilité pour CSMh.

Par ailleurs, Arabe Tehrany *et al.* ont montré que les nanoliposomes à base de lécithine de soja sont toxiques pour les cellules lorsque sa concentration dans le milieu de culture est supérieur à 2 mg/ml (Arab Tehrany *et al.*, 2012). Dans leur étude, les nanoliposomes de saumon ont montré une propriété qui peut assister la prolifération de cellule grâce à ses teneurs en AGPI, notamment l'EPA (20 : 5 n-3) et le DHA (22 : 6 n-3). Ainsi, les concentrations optimales de nanoliposomes de soja et nanoliposomes de saumon utilisées en culture de cellules sont de 10,3 pg/ml et de 5,2 µg/ml, respectivement. Cependant, dans le cas

de cette étude, les concentrations de nanoliposomes choisis dans les films de chitosane sont respectivement 100, 200 et 400 fois supérieures aux concentrations optimales. Ces résultats signifient que l'ajout des nanoliposomes de quantité appropriées dans des biomatériaux à base de chitosane pourrait favoriser l'adhésion et la prolifération cellulaire.

5.1.3. Comportement de CSMh en contact avec des MEC

Les images obtenues par microscopie fluorescente montrent la morphologie des CSMhensemencées sur les films (Fig. V-2). La localisation cellulaire a été démontrée par la présence de leurs noyaux colorés par le DAPI (bleu), au même temps, le cytosquelette des cellules a été coloré par phalloïdine (verte). Le comportement de CSMh en contact avec des différents films est significativement différent.

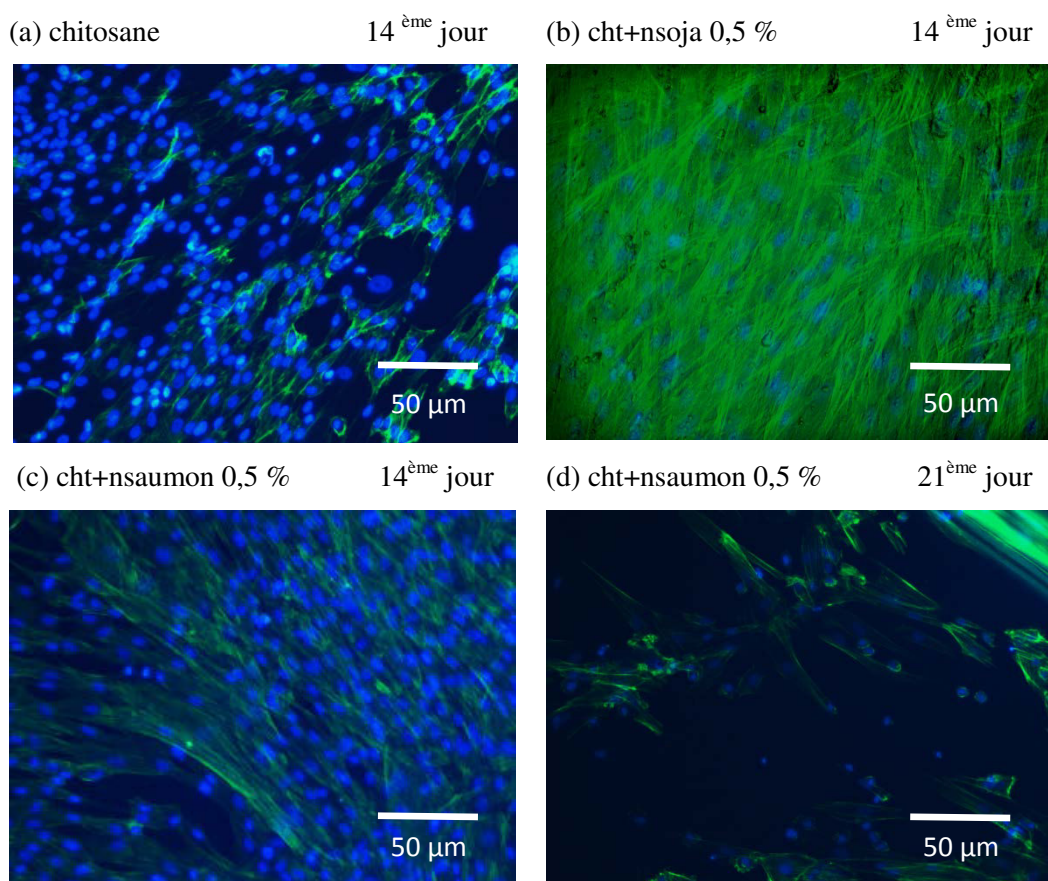


Figure V- 2 : Morphologie des CSMh ensemencées sur les films de chitosane seul et de chitosane mélangé aux nanoliposomes.

Cht+nsoja et cht+nsaumon représentent respectivement les films de chitosane mélangé aux nanoliposomes de soja et de saumon. Les CSMh sur (a) : le film du chitosane seul au 14^{ème} jour de culture cellulaire ; (b) Les films de cht+nsoja 0,5 % ; (c) le film de cht+nsaumon 0,5 % au 14^{ème} jour et (d) le film de cht+nsaumon 1 % au 21^{ème}

jour. Les cellules observées ont été fixées et colorées avec la phalloïdine (filaments d'actine, vert) et DAPI (noyaux, bleu) avant la visualisation par microscopie à fluorescence.

Une faible densité des cellules a été observée initialement au 7^{ème} jour pour tous les films minces (Images non présentés). A partir de 14^{ème} jour, les CSMh sur le film du chitosane seul présentent un grand nombre de noyaux réguliers (coloration DAPI-bleu) et peu de cytosquelette (coloration verte-phalloïdine faible), ce qui montre une bonne prolifération et une faible extension des cellules (Figure V-2 a). En revanche, les films de cht+nsoja 0,5 % semblent favoriser l'extension par rapport à la prolifération des cellules (coloration verte-phalloïdine plus élevée que coloration bleu DAPI) (Figure V-2 b). Mais cette prolifération n'est pas assez homogène. En comparant avec les films de cht+nsoja 0,5 % au 14^{ème} jour, les films de cht+nsaumon 0,5 % fournissent des supports plus équilibrés pour la croissance des cellules (la proportion de coloration verte-phalloïdine et bleu-DAPI est quasiment équilibrée) (Figure V-2 c). La densité globale des cellules se maintient de 14^{ème} jour jusqu'au 21^{ème} jour pour les films de cht+nsoja 0,5 % et cht+nsoja 1 %. (Images non présentés). La croissance cellulaire sur les films de chitosane se stabilise au 21^{ème} jour de culture.

Étonnamment, les films de cht+nsaumon 0,5 % présentent une perte de cellule au 21^{ème} jour de culture (Figure V-2 d), cela peut être à cause d'un effet de confluence¹⁷ trop fort.

Aucune cellule n'a été détectée au 14^{ème} jour et le 21^{ème} jour pour le film de cht+nsoja 2 %. Le résultat a montré que les films de cht+nsoja 2 % n'est pas approprié pour une longue durée de culture de CSMh. La description des morphologies et la densité des cellules sur chaque film mince ont été décrites dans le Tableau V-1.

¹⁷ En termes de culture cellulaire, il s'agit le degré d'écartement qui existe entre cellules adhérentes cultivées en monocouche sur un support approprié.

Films	7 ^{ème} jour	14 ^{ème} jour	21 ^{ème} jour
Chitosane	Initiation de la croissance cellulaire	Une bonne prolifération mais faible extension des cellules	maintient la bonne prolifération mais faible extension des cellules
Cht+nsoja 0,5 %		L'extension est plus importante que la prolifération des cellules	maintient une bonne extension
Cht+nsoja 1 %		L'extension et la prolifération sont plus faible que cht+nsoja 0,5 %, mais double celui du 7 ^{ème} jour	maintient une densité égale à celui de 7 ^{ème} jour
Cht+nsoja 2 %		Mort des cellules	Mort des cellules
Cht+nsaumon 0,5 %		La densité des cellules est 16 fois plus importante que celui de 7 ^{ème} jour, l'extension des cellules est homogène	Perte de la moitié des cellules probablement à cause de la confluence
Cht+nsaumon 1 %		La densité des cellules est 4 fois supérieure à celle du 7 ^{ème} jour	Doublement de la densité des cellules par rapport à celle du 14 ^{ème} jour
Cht+nsaumon 2 %		La densité des cellules reste quasiment la même que celui de 7 ^{ème} jour, pas d'extension des cellules	Doublement de la densité des cellules par rapport à celle du 14 ^{ème} jour

Tableau V- 1 : Morphologie et densité des cellules sur chaque film mince.

Confirmation par de quantification d'ADN des CSMh

Au 14^{ème} jour, on observe une augmentation très significative de la teneur d'ADN, qui peut justifier la prolifération des CSMh sur les films de cht+nsoja 0,5 %, cht+nsaumon 0,5 % et cht+nsaumon 1 %. Ensuite, cette teneur d'ADN reste stable, à l'exception d'une diminution au 21^{ème} jour pour le film de cht+nsaumon 0,5 %. Cette chute de teneur en ADN peut être due à la perte de cellules. La teneur d'ADN n'a pas été détectée pour le film de cht+nsoja 2 % au 14^{ème} et 21^{ème} jour, cela confirme que les cellules se sont décollées des films. Il s'agit également de confirmer qu'au 21^{ème} jour, les cellules ont tendance à se décoller des films à cause d'une prolifération excessive. Les résultats de quantification de l'ADN des CSMh confirment bien les descriptions dernières (Figure V-3).

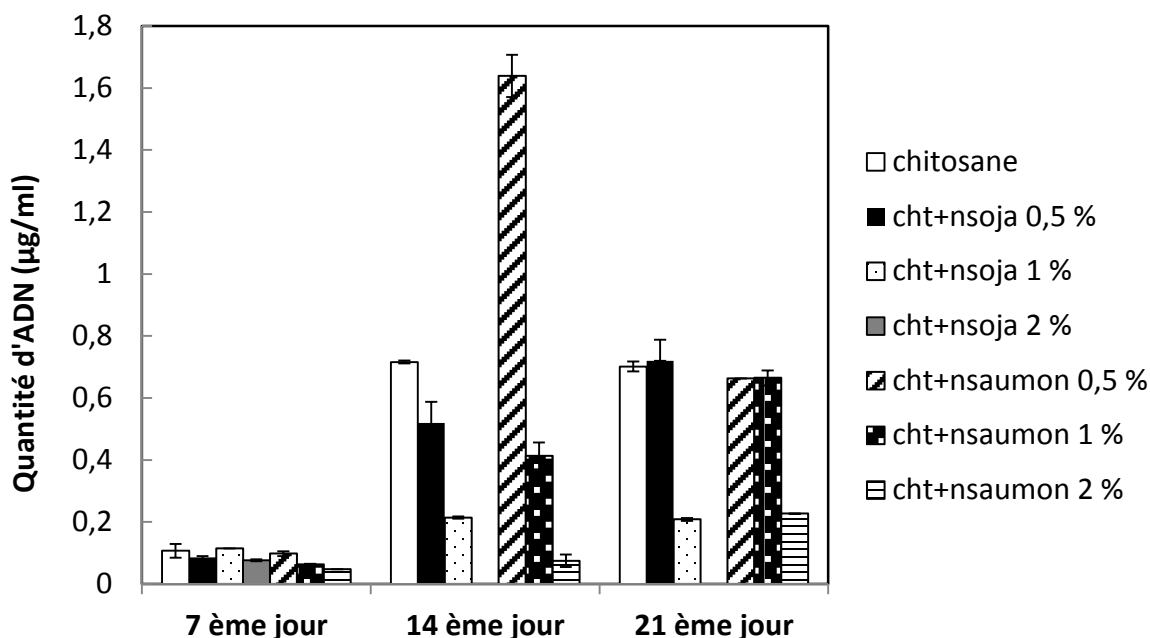


Figure V- 3 : Évaluation de la quantité d'ADN (µg/ml) produit par les CSMh pendant 21 jours.

La teneur d'ADN correspond à une densité cellulaire. Un facteur de conversion de 8,5 pg d'ADN/cellule a été déterminé dans des études précédentes (Wang *et al.*, 2010). Donc, le nombre de cellules par ml du milieu de culture (Figure V-4) peut être estimé par la formule

$$N = \frac{M}{8,5 \times 10^{-6}} \quad \text{V-1}$$

où M est la quantité d'ADN (µg/ml) mesurée par absorbance.

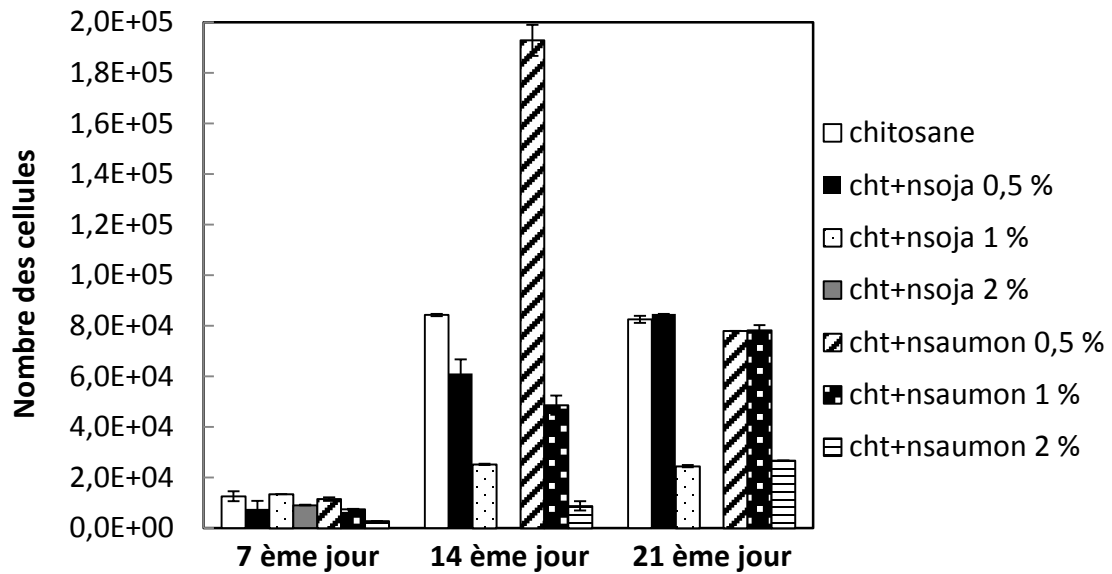


Figure V- 4 : Nombre de cellules par ml du milieu de culture estimé par la quantité d'ADN.

5.1.4. Evaluation de l'activité métabolique des CSMh pendant 21 jours

La Figure V-5 indique une évolution de l'activité métabolique des CSMh étudié en utilisant le test MTT durant 21 jours.

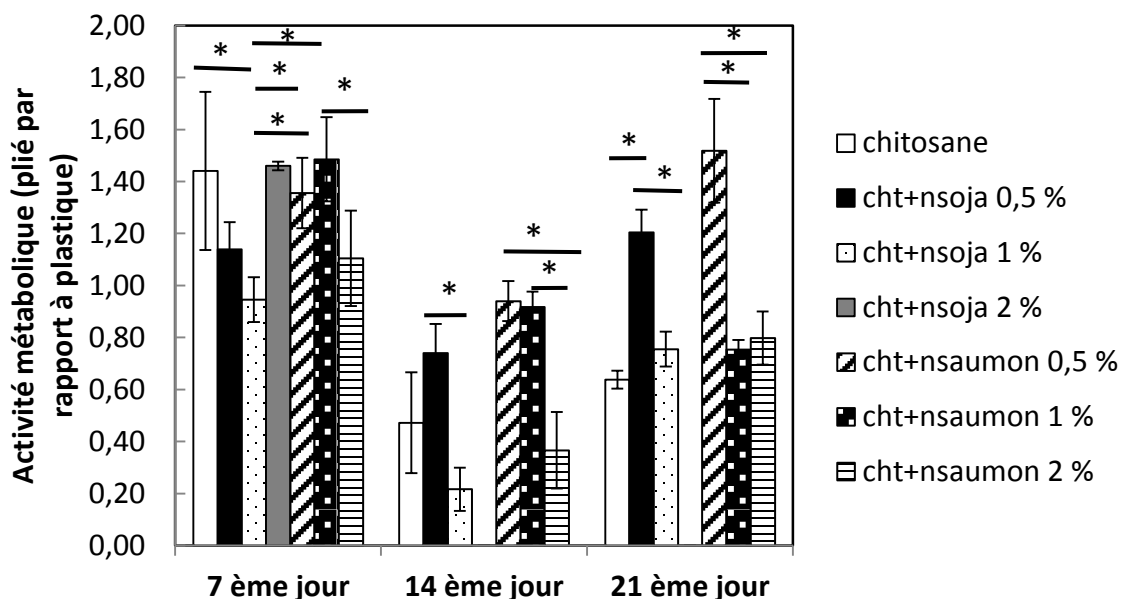


Figure V- 5 : Activité métabolique des CSMh durant 21 jours de culture cellulaire. Le plastique consititue en un support classique pour la culture cellulaire. * différence significatif.

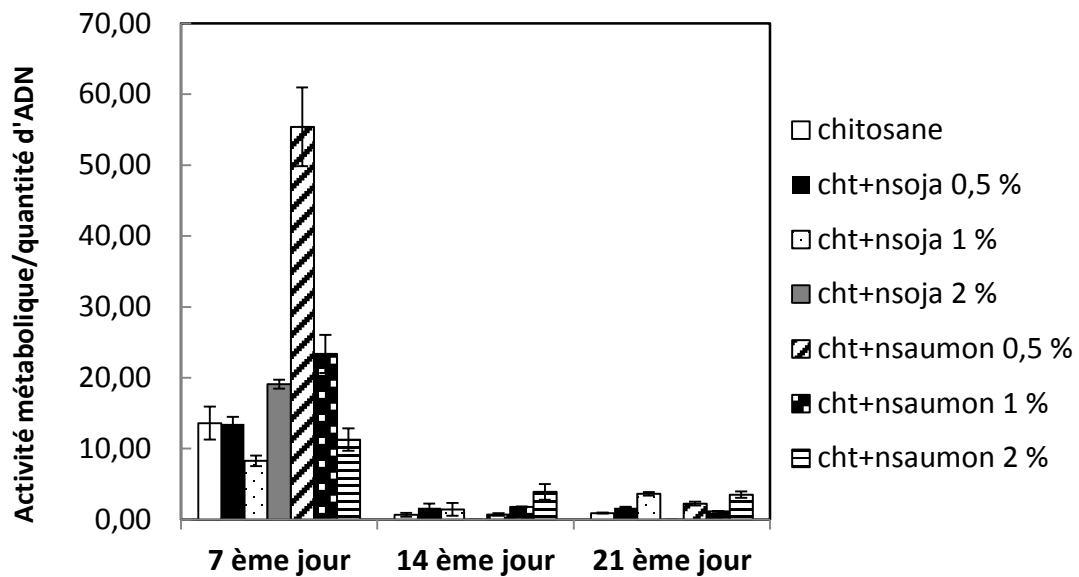


Figure V- 6 : Rapport d'activité métabolique sur la quantité d'ADN par ml de milieu de culture en fonction du temps.

Toutes les cellules ont montré une augmentation de l'activité métabolique au 7^{ème} jour. Cela signifie que la nature des matériaux est très favorable à l'activité métabolique des cellules (Fig. V-5). Ensuite, une diminution significative de l'activité métabolique a été observée au 14^{ème} jour pour tous les films. Puis cette valeur augmente à nouveau au 21^{ème} jour pour cht+nsoja 0,5 %, cht+nsoja 1 %, cht+nsaumon 0,5 %, et cht+nsaumon 2 %. Au même temps, cette valeur se stabilise pour le chitosane seul et cht+nsaumon 1 %. Un rapport de l'activité métabolique et de la teneur de l'ADN a été calculé et montré dans la Figure V-6. Il permet de normaliser l'activité métabolique selon la quantité d'ADN. Comme la teneur en ADN est le reflet du nombre de cellules (la prolifération cellulaire représente la duplication de l'ADN). Donc ce rapport peut être considéré comme une activité métabolique normalisée en fonction du nombre de cellules. Ces résultats indiquent que les cellules sont liées actives pendant les 7 premiers jours de culture. Lorsque la confluence devient stable, l'activité métabolique des cellules revient à un niveau normal moyen.

5.1.5. Interactions entre les cellules et la matrice de support

L'interaction entre cellules et biomatériaux en cours de culture est compliquée. Elle dépend du type cellulaire et des caractéristiques des biomatériaux. Dans l'étude de Lin *et al.* (2008), vu que les nanoparticules d'or peuvent changer la microstructure du matériau, l'ajout

de ces nanoparticules dans la matrice à base de chitosane non seulement donne un effet sur la résistance mécanique de la matrice, mais aussi sur la réponse cellulaire (Lin *et al.*, 2008). En outre, la surface non seulement affect ses caractéristiques mécanique (dureté, résistance élastique), mais sa structure cristallographique donner un effet positif à l'alignement et l'orientation cellulaire.

Selon les résultats obtenus, il est à noter que les CSMh préfèrent globalement pousser sur le film de cht+nsaumon que sur le film de cht+nsoja. En comparant les caractéristiques de surface de ces deux matrices, il n'y a pas de différence significative sur la valeur de S_k et E_k ; cela signifie que la forme des aspérités de surface est uniforme. Même si les valeurs de R_a et R_q de film de cht+nsoja sont plus importantes que celles des films de chitosane seul et de cht+nsaumon. Cela veut dire que la rugosité de la surface de ces films est légèrement différente. En revanche, la microstructure est toujours homogène pour ces deux types de matrices en termes de rugosité de surface, la rigidité et la force d'adhésion du film de cht+nsoja apparaissent hétérogènes à cause de la présence de micro-domaines de surface liés aux rugosités. D'après la mesure, ces micro-domaines rendent le film de cht+nsoja plus mou que les autres films.

Les modifications chimiques à la surface peuvent également modifier l'hydrophilie de la surface (Luna *et al.*, 2011). Les interactions bio-environnement/matériaux pourraient être déterminées par les caractéristiques de la surface. L'adhésion cellulaire dépend essentiellement de l'énergie de surface et du gonflement du matériau. L'activité métabolique et la prolifération cellulaire dépendent de la concentration des nanoliposomes et également de la composition de lécithine. Dans un certain nombre d'études, l'adhésion cellulaire semble être maximisée sur la surface de mouillabilité intermédiaire (l'angle de contact de l'eau entre 60° - 80°) (Saltzman and Kyriakides, 2014). D'autre part, certains auteurs ont identifié des groupements chimiques spécifiques de la surface du polymère, tels que (-OH) et (C=O), qui sont des facteurs importants parce qu'ils déterminent l'adhésion cellulaire à la surface des matériaux (Saltzman and Kyriakides, 2014). Les nanoliposomes apportent ces types de groupements dans des films à base de chitosane, ce qui pourrait influencer fortement l'adhésion cellulaire sur le film de chitosane mélangé aux nanoliposomes. En effet, le film de cht+nsoja à une concentration de 1 mg/ml permet d'augmenter la prolifération cellulaire alors que le film de cht+nsaumon à une concentration de 1 mg/ml et 2 mg/ml semble avoir un effet comparable. Ces différences peuvent être expliquées par la composition en acides gras de chaque lécithine. La lécithine de soja est composée de plusieurs acides gras insaturés, tandis

que la lécithine de saumon est constituée d'un grand nombre d'acides gras différents. C'est pourquoi les films cht+nsaumon semblent montrer un effet plus importante sur la prolifération cellulaire lorsque la concentration est plus faible. Düzgünes et Nir (Düzgüneş and Nir, 1999) ont montré que les cellules différentes peuvent avoir des «récepteurs» de liposomes différents, ces « récepteurs » vont forcément influencer la capacité d'endocytose des acides gras par des cellules. La diversité des acides gras de la lécithine de saumon fournit une meilleure possibilité de créer une liaison liposomes-cellules.

Il est évident que l'ajout d'une certaine quantité de nanoparticules stimule la prolifération cellulaire car les cellules sont sensibles à la modification de surface à l'échelle nanométrique. Cependant, si cette quantité est trop élevée, les effets stimulants sur la prolifération cellulaire et l'expression des gènes peuvent être moindres. Ceci a été prouvé dans l'étude de Arab Tehrany *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2008 ; dans le cadre de ces publications, la teneur des nanoliposomes optimale utilisée est de 10,3 pg/ml pour les nanoliposomes de soja et de 5,2 µg/ml pour les nanoliposomes de saumon. Dans le cas de notre étude, cette teneur optimale est de 1 mg/ml pour les deux nanoliposomes. Cela pourrait également expliquer le fait que le film de cht+nsoja 2 % ne favorise pas la prolifération cellulaire.

La densité de charge de la surface du polymère est un autre argument en faveur de l'adhésion cellulaire et de la prolifération. Dans l'étude de Schipper *et al.*, la cytotoxicité de chitosane semble être liée à la densité de charge positive qu'il possède (Schipper *et al.*, 1996). Les nanoliposomes possèdent moins de cytotoxicité cellulaire en raison de la présence de charges négatives.

Il est à noter que l'obtention des images des cellules à haute résolution sur les films est une tâche délicate parce que le DAPI et/ou la phalloïdine peuvent également colorer les films. En outre, la résolution des images dépend aussi de l'épaisseur et de la couleur des films.

Jusqu'à présent, de nombreux polymères naturels couramment utilisés pour tester la biocompatibilité sont des mélanges complexes ; il n'existe aucun moyen d'analyser le comportement cellulaire (l'adhésion, la croissance, la prolifération de cellules...) via seulement les caractéristiques de matrices de support. En revanche, le comportement cellulaire peut être corrélé à certaines propriétés physico-chimiques à la teneur en eau à l'équilibre et à la topographie à l'échelle nanométrique de matrices de supports, ce qui permet de le prévoir.

5.2. Évaluation de la biodégradabilité *in vitro*

5.2.1. Mécanisme de biodégradabilité par lysozyme d'un polymère à base de chitosane

La biodégradation de chitosane par le lysozyme peut être expliquée par le mécanisme de la dégradation enzymatique. Le lysozyme contient un site de liaison hexamérique, et une séquence d'hexasaccharide contenant plus que trois unités acétylés qui est essentiellement responsable de la cinétique de dégradation initiale de chitosane (Freier *et al.*, 2005; Tanuma *et al.*, 2010). La Figure V-7 illustre l'attaque du chitosane au niveau de la liaison β (1 \rightarrow 4) par le lysozyme.

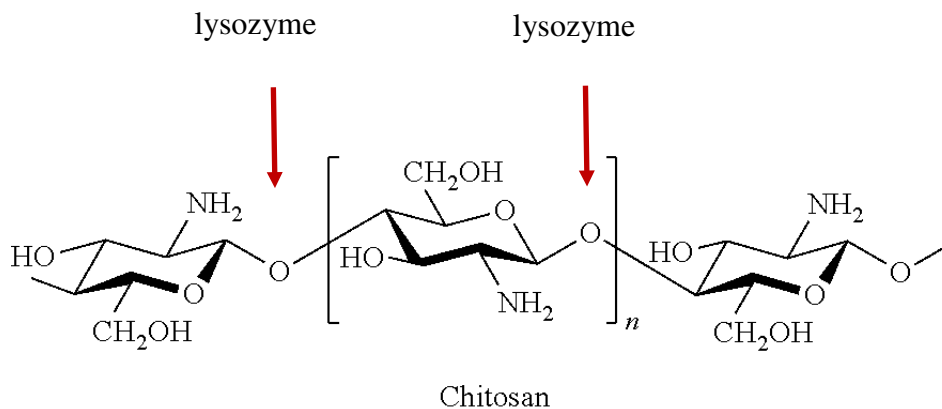


Figure V- 7 : Attaque du chitosane au niveau de la liaison β (1 \rightarrow 4) par lysozyme.

De nombreux chercheurs ont étudié le comportement du chitosane dans les conditions de dégradation *in vitro* par le lysozyme (Freier *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2007; Tanuma *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2010). La plupart des études ont évalué la dégradation de ces matériaux en étudiant sur la perte de masse, le résidu de sucre réducteur, et la masse moléculaire des hydrolysats dans le milieu de dégradation (Han *et al.*, 2012). En revanche, peu d'étude font en l'évaluation de degré déacétylation, du taux de cristallinité en fonction du temps de dégradation.

5.2.2. Biodégradation en volume et/ou en surface

D'après Burkersroda *et al.*, (2002), le biomatériau polymérique subit une érosion en volume (« bulk erosion »), résultant d'une vitesse de dégradation des chaînes polymériques

plus faible comparée à la vitesse de pénétration de l'eau à l'intérieur de la matrice. Avec ce type d'érosion, la matrice entière subit une perte de masse alors que la taille de substrat reste la même durant un temps considérable. Cependant, lorsque la vitesse de dégradation du polymère devient plus importante que la vitesse de diffusion de l'eau à l'intérieur de la matrice, l'érosion en surface (« surface erosion ») est observée et le volume de la matrice diminue au cours du temps. Plus précisément, cette dernière est appelée « dégradation hydrolyse » (Lendlein *et al.*, 2011).

D'après les images MEB (Figure V-8), la surface des films du chitosane seul est lisse même après 28 jours d'incubation dans la solution du PBS contenant 10 mg/l lysozyme. En revanche, une modification microstructure commence à apparaître à l'intérieur des films de cht+nsoja et cht+nsaumon à partir du 21^{ème} jour d'incubation (Figure V-9). Notamment pour le film de cht+nsaumon, la surface reste quasiment la même que celle avant l'incubation, au contraire, une modification microstructure commence à se former à l'intérieur. Selon les travaux de Shah *et al.* (1993), des structures poreuses peuvent être observées suite à l'érosion de la matrice, notamment lorsque des polymères amorphes sont utilisés (Shah *et al.*, 1993). Autrement dit, dans le cas de polymères cristallins, la cristallisation des produits de dégradation empêche la modification microstructure (Brannon-Peppas and Vert, 2000).

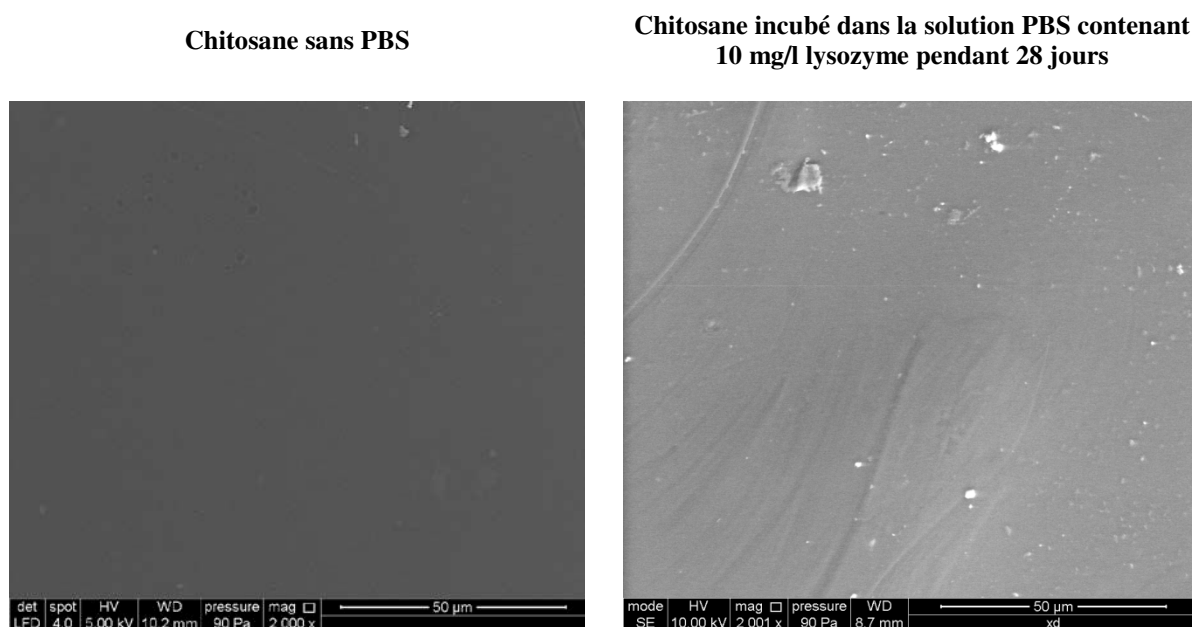


Figure V- 8 : Films de chitosane seul, avant et après incubation dans une solution PBS contenant 10 µg/ml lysozyme pendant 28 jours (MEB).

Surface

Intérieur

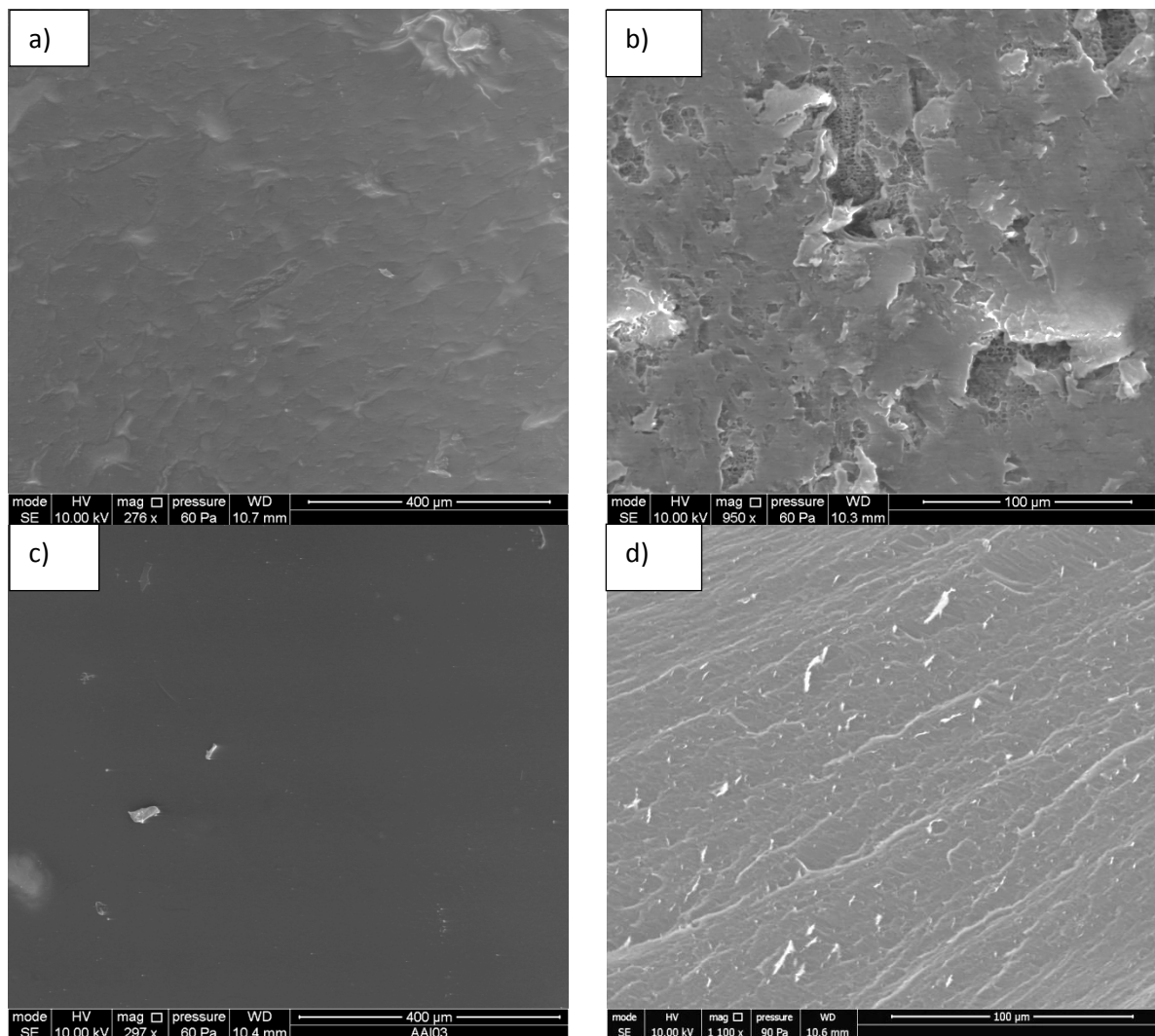


Figure V- 9 : Films de cht contenant des nanoliposomes de soja (a) et (b) ; de saumon (c) et (d) incubés dans une solution PBS contenant 10 μ g/ml lysozyme pendant 21 jours (MEB).

À partir du 28^{ème} jour d'incubation, la surface des films de cht+nsoja commence à apparaître les trous (Figure V-10). Les pores intérieurs deviennent plus nombreux qu'au 21^{ème} jour. En revanche, la surface des films de cht+nsaumon reste toujours lisse. Les pores intérieurs apparaissent plus réguliers et homogènes.

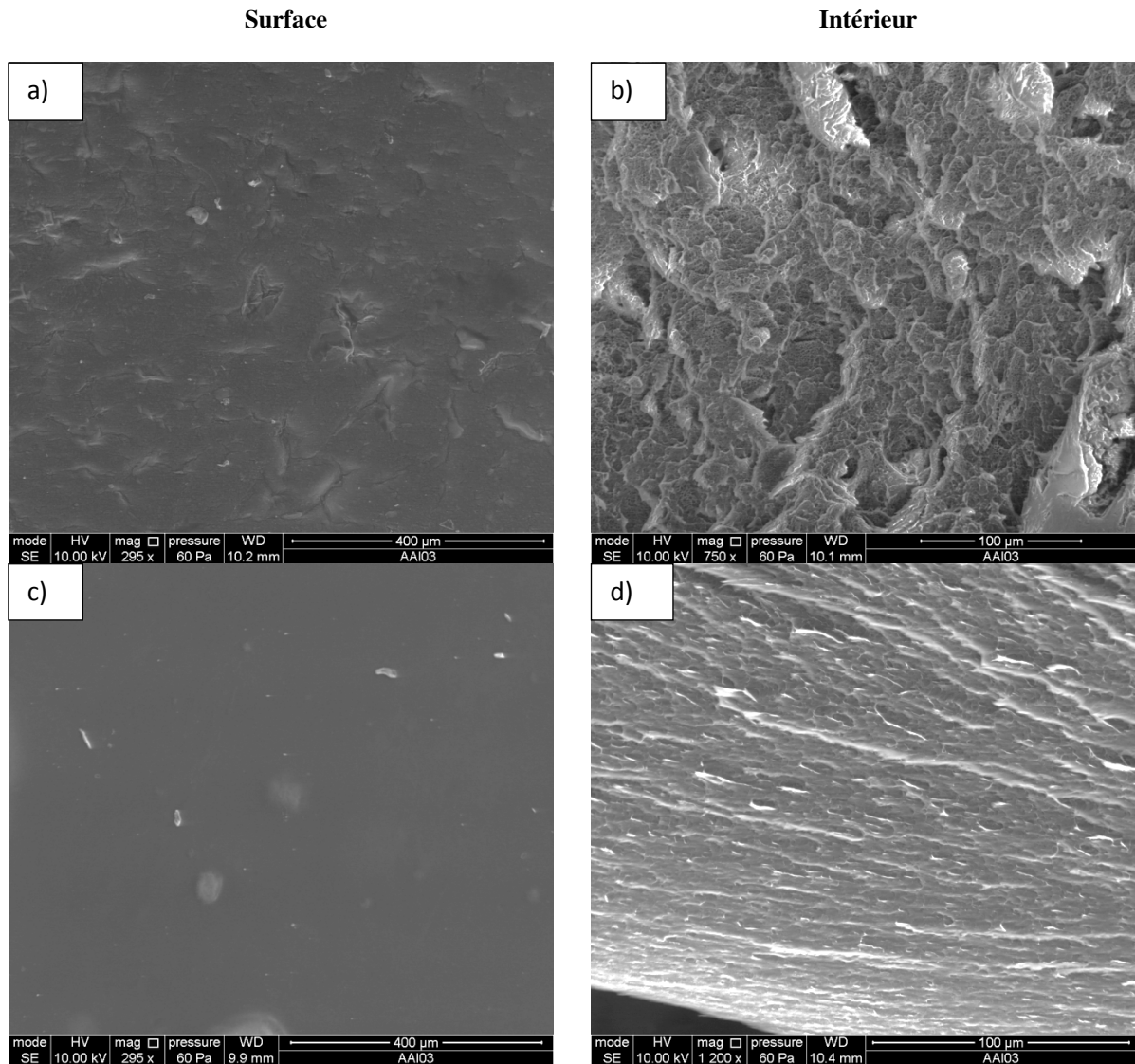


Figure V- 10 : Films de cht contenant des nanoliposomes de soja (a) et (b) ; de saumon (c) et (d) incubés dans une solution PBS contenant 10 mg/ml lysozyme pendant 28 jours.

D'après la mesure de variation de la masse des films, le gonflement des films après 24 h d'incubation est respectivement de 157 %, 152 %, et 173 % pour le chitosane seul, le cht+nsoja et le cht+nsaumon (Figure V-11). Une diminution de masse est observée au 7^{ème} jour. Aucune variation de masse significative n'est observée pour aucun film après le 14^{ème} jour d'incubation. Autrement dit, la teneur de l'eau des films arrive à saturation à partir du 14^{ème} jour d'incubation.

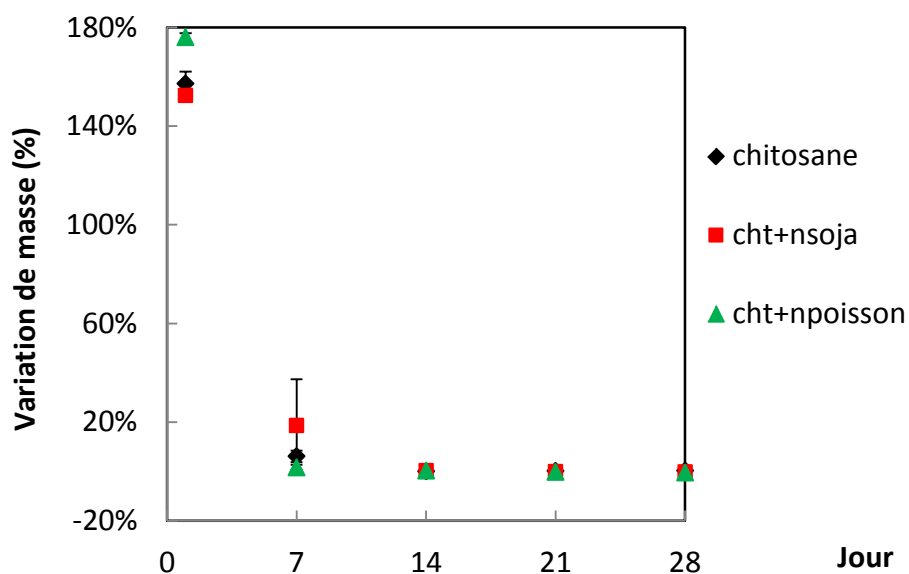


Figure V- 11 : Variation de la masse des films de chitosane, de cht+nsoja, et de cht+nsaumon dans une solution PBS+10 µg/ml lysozyme pendant 28 jours.

5.2.3. Mouillabilité et degré de déacétylation (DD) durant la biodégradation

Plusieurs facteurs peuvent affecter la dégradation de la matrice polymérique, tels que la mouillabilité de la surface et le DD (Shigemasa *et al.*, 1994). Ces paramètres peuvent également être évalués durant la biodégradation.

Evaluation de la mouillabilité de la surface

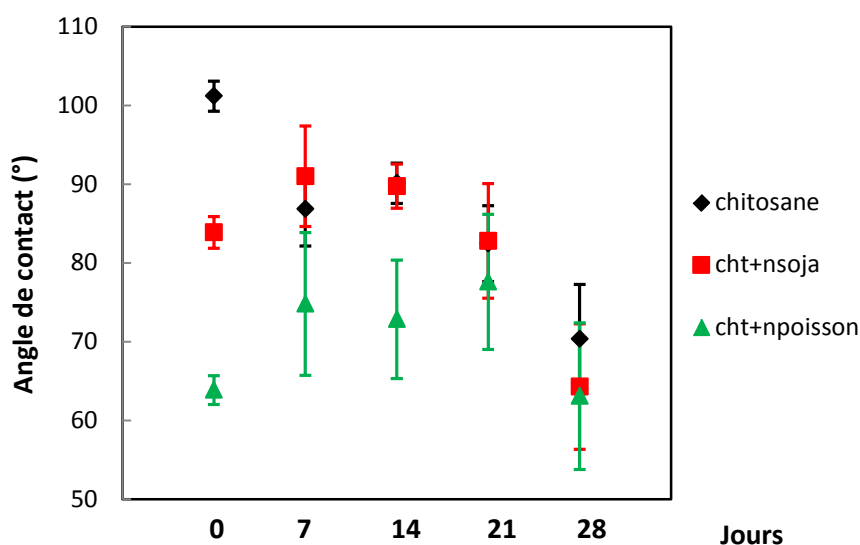


Figure V- 12 : Angle de contact de films de chitosane, de cht+nsoja et de cht+npoisson au cours de 28 jours d'incubation.

L'hydrophobicité déterminée par l'angle de contact, qui est représentée dans la Figure V-12, peut être corrélée à la cinétique de dégradation de polymères (variation de masse, variation de masse moléculaire). En général, l'augmentation de l'hydrophobicité permet d'augmenter la cinétique de dégradation (Uhrich *et al.*, 1995). Une ANOVA à un facteur a été réalisée pour vérifier que l'angle de contact de chaque type de film reste le même durant 28 jours.

Dans le cas du film de chitosane seul, une hypothèse nulle H_0 a été proposée : l'angle de contact ne varie pas pendant 28 jours. La valeur moyenne et la variance de l'angle de contact ont été obtenues à partir de sept répétitions de mesures différentes qui sont listées dans le Tableau V-2.

1) Moyenne et variance de l'angle de contact

Groupes	Nombre d'échantillons	Somme	Moyenne	Variance
0	7	708,3	101,2	6,3
7	7	608,0	86,9	42,0
14	7	630,9	90,1	8,5
21	7	577,2	82,5	31,1
28	7	492,5	70,4	108,4

2) Analyse de la variance

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	3536,5	4	884,1	22,5	3,5E-09	2,5
A l'intérieur des groupes	1177,0	30	39,2			
Total	4713,6	34				

Tableau V- 2 : « ANOVA un facteur » appliqué au film de chitosane seul incubé dans la solution PBS+10 mg/l lysozyme pendant 28 jours.

L'analyse de la variance donne $F = \text{Variance}_{\max} / \text{Variance}_{\min} = 22,5$ (Tableau V-2, 2)), la table du F (4, 30) donne comme valeur critique $F = 2,7$. Ici la valeur F obtenue est supérieure à la valeur de F critique, on considère donc que l'hypothèse nulle est rejetée. Par conséquent, l'angle de contact du film de chitosane varie pendant 28 jours. Une comparaison détaillée est donc nécessaire.

Chitosane	Mi-Mj	t protégé	Résultat
0J/7J	14,3	4,3	<0,05
0J/14J	11,1	3,3	<0,05
0J/21J	18,7	5,5	<0,05
0J/28J	30,8	9,2	<0,05
7J/14J	3,3	1,0	NS
7J/21J	4,4	1,3	NS
7J/28J	16,5	4,9	<0,05
14J/21J	7,7	2,2	<0,05
14J/28J	19,8	5,8	<0,05
21J/28J	12,1	3,6	<0,05

NS = no significative. $p. < 0,05$.

Tableau V- 3 : Comparaison détaillée dans le cas du film de chitosane seul incubé dans la solution PBS+10 mg/l lysozyme pendant 28 jours.

Dans le Tableau V-3, t protégé est calculé par la formule

$$\frac{|M_i - M_j|}{\sqrt{MS \times \left(\frac{1}{N_i} + \frac{1}{N_j}\right)}} \quad \text{Formule V - 2}$$

où M_i et M_j sont les moyennes des groupes comparés, N_i et N_j les nombres de répétitions dans chaque groupe, (N_i et N_j étant égaux 7 dans ce cas) et où MS est la moyenne de carré égale à 39,2.

D'après la table du t-student, nous avons trouvé $t(30, 0,05) = 2,0$, en comparant le t protégé calculé (Tableau V-3) avec t critique, puisque t protégé calculé est supérieur à t critique, donc les groupes sont différents ($p. < 0,05$). Par conséquent, l'angle de contact est significativement différent entre 0 J et 7 J, sa valeur ne varie pas entre le 7^{ème} jour et le 21^{ème} jour, puis elle présente une différence significative au 28^{ème} jour.

D'après le calcul pour les films de cht+nsoja et cht+nsaumon, l'angle de contact de cht+nsoja est significativement différent entre 0 J et 28 J, mais ne varie pas entre le 7^{ème} jour et le 21^{ème} jour, puis présente une différence significative au 28^{ème} jour. En revanche, le film de cht contenant des nanoliposomes de saumon se comporte différemment des films de cht+nsoja et de chitosane. L'analyse de la variance donne $F = \text{Variance}_{\max} / \text{Variance}_{\min} = 3,3$ alors que la table du F (4, 30) donne comme valeur critique $F = 2,7$. Le F calculé est très proche de la valeur critique. Par conséquence, on considère que la valeur de l'angle de contact est constante pendant 28 jours. Cela peut expliquer que la cinétique de dégradation est plus faible pour le film de cht+nsaumon que pour des films cht+nsoja et chitosane seul.

Evaluation de DD

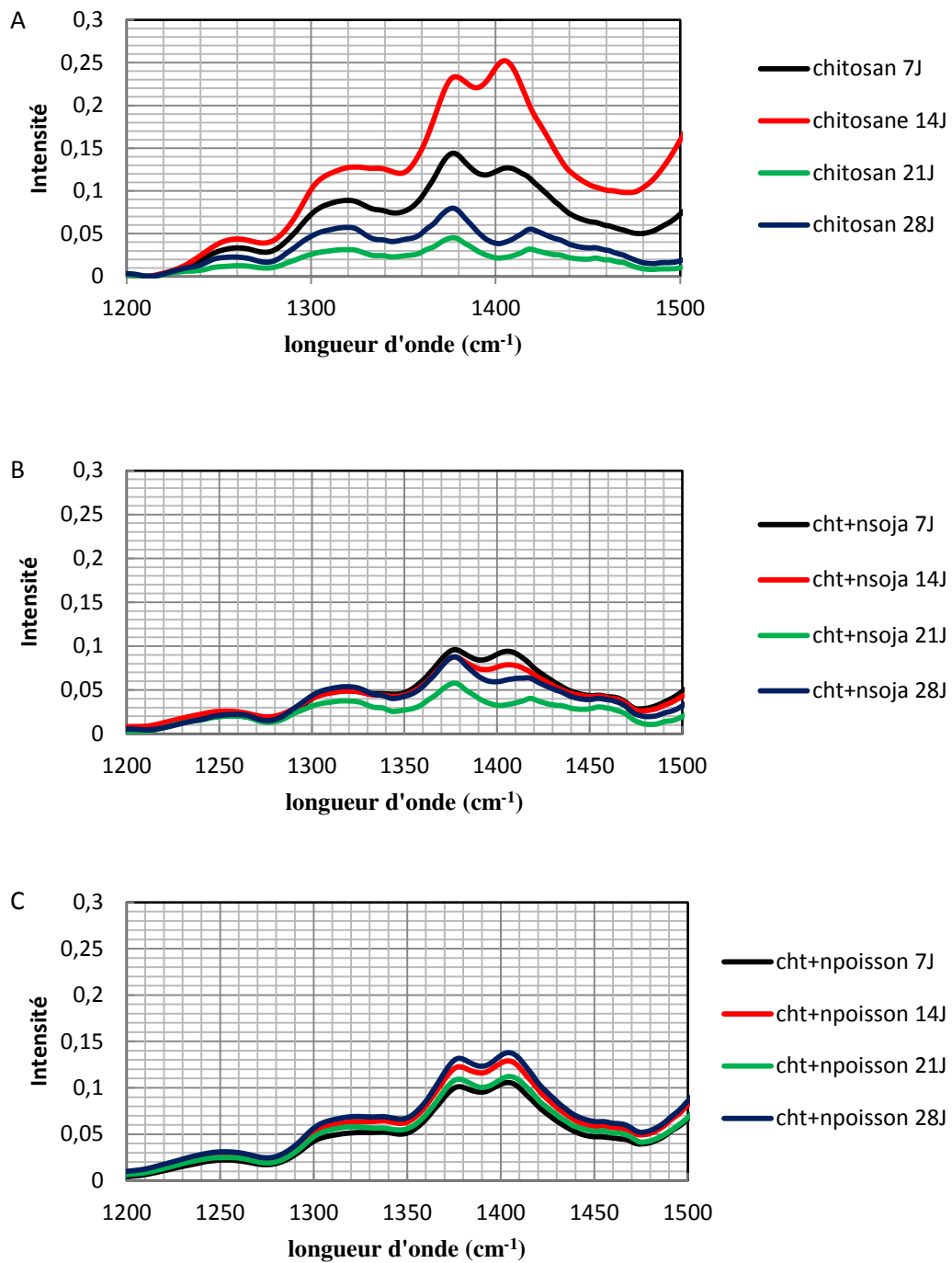


Figure V- 13 : Spectres FTIR-ATR des films de chitosane (A) et des films chitosane/nanoliposomes de soja (B) et de saumon (C) incubés dans une solution PBS+10 mg/l de lysozyme pendant 28 jours.

Jour d'incubation	Chitosane	Cht+nsoja	Cht+nsaumon
7J	A ₁₃₂₀ =0,056 A ₁₄₂₀ =0,103 DD =83,9	A ₁₃₂₀ =0,017 A ₁₄₂₀ =0,022 DD =76,5	A ₁₃₂₀ =0,015 A ₁₄₂₀ =0,025 DD =83,5
14J	A ₁₃₂₀ =0,040 A ₁₄₂₀ =0,062 DD =80,9	A ₁₃₂₀ =0,017 A ₁₄₂₀ =0,013 DD =61,4	A ₁₃₂₀ =0,016 A ₁₄₂₀ =0,029 DD =83,5
21J	A ₁₃₂₀ =0,014 A ₁₄₂₀ =0,010 DD =57,1	A ₁₃₂₀ =0,018 A ₁₄₂₀ =0,008 DD =34,9	A ₁₃₂₀ =0,019 A ₁₄₂₀ =0,025 DD =76,9
28J	A ₁₃₂₀ =0,025 A ₁₄₂₀ =0,017 DD =55,7	A ₁₃₂₀ =0,023 A ₁₄₂₀ =0,012 DD =37,9	A ₁₃₂₀ =0,018 A ₁₄₂₀ =0,028 DD =80,9

Tableau V- 4 : DD estimé des films de chitosane et des films de chitosane + nanoliposomes incubés durant 28 jours dans une solution PBS + 10 mg/l lysozyme en utilisant la formule de Brugnerotto *et al.* (2001) (A_x : intensité du pic à la longueur d'onde x).

Sur les spectres FTIR-ATR (Figure V-13), les valeurs de DD des films, listée Tableau V-4, ont été estimées en utilisant la formule de Brugnerotto *et al.*, (2001). Nous pouvons observer que le DD des films de chitosane et de cht+nsoja commence à diminuer légèrement à partir du 7^{ème} jour d'incubation. Puis cette valeur chute à partir du 21^{ème} jour d'incubation pour les films de chitosane et de cht+nsoja. En revanche, cette valeur pour les films de cht+nsaumon varie très peu durant les 28 jours d'incubation. Rappelons que le mécanisme d'hydrolyse de lysozyme passe par l'attaque du chitosane au niveau de la liaison β (1 \rightarrow 4), cela signifie que le nombre de liaisons N-H au cours de la dégradation augmente. Ainsi, l'intensité du groupement -C-N, N-H (A₁₃₂₀) augmente, et DD diminue en suivant la formule de Brugnerotto *et al.*, (2001) (Formule II-14).

De nombreuses études ont montré que la cinétique de dégradation du chitosane augmente en fonction de la diminution de DD (Hirano *et al.*, 1989). Dans cette étude, la diminution de DD accélère également la cinétique de dégradation. La cinétique de dégradation de film de cht+nsoja semble plus importante que celle de cht+nsaumon. Cela confirme le résultat de l'angle de contact.

D'après la théorie de Shigemasa *et al.* (1994), la conformation de nanoliposomes influence celle de chitosane, cette modification de la conformation augmente la force inter- et intra-moléculaire du chitosane (Shigemasa *et al.*, 1994). Cela entraîne également la distribution aléatoire du groupement acétamide. En effet, Kofuji *et al.* (2005) ont montré par

qu'il ne faut pas déterminer la cinétique de dégradation uniquement par l'estimation de DD (Kofuji *et al.*, 2005).

Conclusion

Dans les études de biocompatibilité *in vitro*, le test de LDH a montré qu'aucun des films ne produit d'effet toxique pour les cellules CSMh. La microscopie fluorescence a montré une bonne adhésion et une prolifération des cellules sur les films de cht+nsoja à 0,5 %, 1 %, cht+nsaumon 0.5 %, et 1 %. Les films de cht+nsaumon 1 % ont démontré une plus forte prolifération cellulaire que les autres films. Ceci peut être lié à ses propriétés de surface, son taux de gonflement, ainsi que ses compositions chimiques. D'après les nombreuses analyses, le taux de gonflement des films de cht+nsaumon 1 % est égal à 171 % après 24 h d'incubation dans la solution PBS. Une plus grande rigidité (1,3 GPa) et une force d'adhérence plus élevée (16,4 nN) ont été trouvées pour ces films. Cela montre que l'adhésion et la prolifération cellulaire dépendent de la microstructure de la surface, de la mouillabilité, de l'énergie de surface et de la rigidité locale de la matrice.

D'après les études de biodégradabilité *in vitro*, les films de chitosane seul et de cht+nsoja subissent une érosion en volume pendant l'incubation. Une chute de DD a été observée pour ces deux types de films. En revanche, les films de cht+nsaumon ont montré un DD et un angle de contact stable pendant 28 jours, cela montre qu'il subit une érosion plus en surface qu'en volume.

- ❖ **Valorisation scientifique** : Une partie du travail réalisé et décrit dans ce chapitre a été soumise dans le journal « Tissue engineering », qui est mis en fin de chapitre. Certains résultats ont aussi fait l'objet de communications orales et par affiches (cf : Annexe-7)

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Rappelons que le but initial de cette étude est d'élaborer les films minces à base de chitosane mélangé aux nanoliposomes constitués de lécithines naturelles et d'étudier leurs caractéristiques physico-chimiques, structurales, biocompatibles, et biodégradables. Dans un premier temps, nous avons caractérisé les propriétés physico-chimiques des nanoliposomes (taille, mobilité électrophorétique, potentiel zêta, composition chimique, classification des lipides, tension superficielle) par différentes méthodes (DDL, CPG, CCM, et tensiomètre). Les résultats obtenus montrent que la taille moyenne et la tension superficielle sont influencées par la composition lipidique des nanoliposomes.

Les caractéristiques multi-échelles des films de chitosane mélangé aux nanoliposomes sont forcément liés aux ceux des nanoliposomes. Lorsqu'on ajoute 10 % des nanoliposomes dans les films de chitosane, la hydrophobicité de la surface s'améliore de 18 % à 36 %. Ce fait est attribué à la présence des composants polaires ; la cristallinité de film de chitosane mélangé aux nanoliposomes est légèrement augmentée ; à 37 °C, le module de Young diminue de 6 GPa jusqu'à près de 5 GPa. Aucune nouvelle liaison ne se crée entre le chitosane et les nanoliposomes. Une diminution de DD est observée, elle peut être due à la conformation des nanoliposomes au sein de films de chitosane.

La mouillabilité de surface des films mince de chitosane et de chitosane mélangé aux nanoliposomes est améliorée par le traitement par plasma froid. Les groupes fonctionnels tels que C-O, -NH, -NH₂ sont greffés sur la surface des films, qui entraînent une amélioration de l'énergie de surface des films minces. L'effet du traitement par plasma dépend de la nature du film, en particulier de la nature de nanoliposomes. Il a également fourni plus d'efficacité et plus d'avantages que l'incorporation des nanoliposomes dans les films. Cependant, la stabilité de l'effet de traitement par plasma dépend des conditions de stockage, de la nature et du mélange gazeux du traitement des échantillons traités. Les liaisons hydrogènes entre les groupes polaires créés par le traitement peuvent être éliminées partiellement après un temps donné, ce qui peut expliquer pourquoi de nombreux chercheurs n'ont pas réussi à trouver une meilleure mouillabilité dans leurs échantillons traités. Par voie de conséquence, la fonctionnalisation en volume par l'ajout des nanoliposomes est meilleure du point de vue de la stabilité pour des applications d'ingénierie tissulaire.

Cependant la caractérisation physico-chimique des films de chitosane mélangé aux nanoliposomes de soja et de colza, montre quasiment les mêmes propriétés. En revanche, les films de chitosane mélangé aux nanoliposomes de saumon se comportent différemment, ceci

est sans doute lié aux compositions chimiques de différents lécithines. Il est à noter que les films de chitosane mélangés aux nanoliposomes de saumon montrent une bonne biocompatibilité, ainsi qu'une stabilité pendant 28 jours d'incubation dans la solution PBS contenant 10 mg/l de lysozyme.

Pour la perspective de ce travail, il serait intéressant de connaître la forme des nanoliposomes dans les films de chitosane. Il est à noter qu'il est difficile de préparer les éprouvettes fines à partir des films à base de chitosane, incubés dans un mélange de résine (embed 812) et propylène oxyde, pour pouvoir faire une analyse de morphologie par microscopie électronique transmission.

Selon nous, l'étude des interactions entre les cellules et les matrices de support n'a pas été assez développée puisqu'elle a consisté uniquement à vérifier la biocompatibilité de ces nouvelles matrices. Donc les prochains travaux devraient s'orienter vers l'effet de la forme des nanoliposomes dans les films de chitosane. C'est-à-dire qu'il est indispensable d'étudier aussi l'effet d'ajout des lécithines directement dans les films de chitosane, de comparer les caractéristiques physico-chimiques entre les films de chitosane mélangés aux lécithines et aux nanoliposomes. Ceci permettrait de savoir si la forme des nanoliposomes joue un rôle important pendant l'adhésion, la croissance et la prolifération cellulaire.

Il conviendrait aussi d'étudier le comportement des films dans un bioréacteur de chargement mécanique, qui peut appliquer une contrainte mécanique uni axiale ou bi axiale, afin de compléter l'évaluation de la biodégradabilité *in vitro*.

Enfin, le développement d'une matrice de support 3D est indispensable dans la future étude car une architecture contrôlée permet de diriger l'organisation, la croissance et la différenciation des cellules. Dans un premier temps, la technique d'« électrofilage » a été choisie pour synthétiser des fibres fonctionnalisées de diamètres variables et contrôlés. Une étude sera utile pour vérifier quels sont les paramètres dirigeants du procédé et déterminer les conditions adéquates pour obtenir de fibres orientés et alignés.

ANNEXE

Annexe-1 : Préparation du réactif acétate d'uranyle (VI) ($\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$) à 2 % en masse, dissoudre 0.1 g d'acétate d'uranyle (VI) dans 5 ml de H_2O (résistivité = 18,2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$).

- Déposer une goutte de solution de nanoliposomes (dilué 20 fois) sur la grille MET pendant 3 minutes ;
- Couper le papier de filtre en triangle ;
- Au bout de 3 minutes, absorber l'excédent de la solution avec le « triangle » de papier de filtre sans toucher la grille ;
- Déposer une goutte d'acétate d'uranyle (VI) (2%) sur la grille pendant 90 secondes ;
- Au bout de 90 secondes, absorber l'excédent d'acétate d'uranyle (VI) 2 % avec le « triangle » de papier de filtre sans toucher la grille ;
- Laisser sécher pendant 5 minutes ;
- L'échantillon séché est enfin prêt pour l'analyse au MET.

Annexe-2 : Réactifs et matériels pour l'analyse des acides gras.

Réactifs	Matériels
<ul style="list-style-type: none">- Méthanol (SDS)- n-hexane 7 % (SDS)- Trifluorure de Bore 7 % dans méthanol (SDS)- Molécules standards : acide gras polyinsaturé (AGPI 1, origine végétale) et AGPI 2 (origine marine) (Supelco, Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, USA)	<ul style="list-style-type: none">- Système CPG: GC 2010 séries (Shimadzu)Colonne capillaire 60 m × 0.25 mm i.d × 0.25 µm (Supelco, USA)- Gaz : Azote, mélange azote/oxygène, hydrogène (Air liquide)- Matériel courant de laboratoire

Annexe-3 : Mode d'emploi à déterminer des différentes classes de lipides par CCM.

Le support chromatographique (Chromarod®) est composé d'une baguette de quartz de 1 mm de diamètre recouverte d'une pellicule de silice (SiO₂) de 75 µm d'épaisseur. La silice utilisée est formée de grains fins (diamètre = 3-5 µm) collés ensemble à l'aide de liant inorganique.

Après le dépôt des échantillons sur les Chromarods®, ceux-ci migrent dans le milieu des bains de solvants organiques variés. , la détection s'effectue par brûlage au sein d'une flamme dans laquelle les éluats sont vaporisés puis ionisés. Le brûlage et le traitement des données sont effectués par le logiciel Chromstar™ qui permet l'obtention de pics gaussiens représentatifs de la composition des échantillons.

Des analyses de type « brûlage complet ou partiel » ont été réalisées sur les échantillons dans les conditions suivantes: débit d'hydrogène 160 ml/min; débit d'air, 2 L/min. Le mode opératoire est le suivant : 2 µl de lécithine à 5 mg/ml de mélange de solvant sont déposés sur les chromarods®, puis séchés à 100 °C pendant une minute dans une atmosphère saturée en humidité (10 minutes dans une enceinte saturée en NaCl). La migration des lipides en fonction de leur affinité pour le mélange éluant a lieu dans des cuves adaptées à ce type de réaction. Le premier mélange de solvants utilisé (hexane : éther diéthylique : acide formique, 80 : 20 : 0,2, temps de migration 20 minutes) permet de séparer des composés apolaires (TAG) et des composés polaires (phospholipides et glycolipides). Alors que les composés apolaires migrent sur les chromarods®, les composés polaires restent au niveau de la ligne de dépôt. Le brûlage complet des chromarods® permet de définir le ratio lipides polaires et apolaires. Les autres subissent un brûlage partiel : les TAGs sont révélés lorsque les lipides polaires font l'objet d'une seconde élution (Al-sayed mahmoud, 2007).

Le second mélange de solvant utilisé (chloroforme : méthanol : ammoniacque, 65 : 35 : 5, temps de migration 45 minutes), permet de séparer des composés polaires (phospholipides et glycolipides). Les différents composés polaires présents sont alors séparés par discrimination de leur temps de rétention.

Des gammes d'étalons dans l'Annexe-4 ont permis d'identifier des différentes classes lipidiques. Chaque analyse de standard et d'échantillon a été répétée trois fois.

Annexe-4: Liste des étalons utilisés (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Germany) pour identifier des différentes classes lipidiques de lécithin.

Lipide neutre	phospholipides
<ul style="list-style-type: none"> - 1 – monostearoyl – rac – glycerol - 1, 2 – dipalmitoyl – snglycerol - tripalmitin, cholesterol 	<ul style="list-style-type: none"> - L – a – phosphatidylcholine - 3 - sn - phosphatidylethanolamine - L – a – phosphatidyl – L – serine - L – a – phosphatidylinositol - lyso – phosphatidylcholine sphingomyelin

Annexe-5: Mode opératoire du test Hoechst 33258.

✚ Préparation des solutions :

1) Tampon hoechst

Tableau 1	Quantité en mmole	Volume total solution 500 ml	Volume total solution 250 ml	Volume total solution 100 ml
Tris Base sigma T15031K	10	2,92 g	1,46 g	584 mg
EDTA k13490018	1	0,606 g	0,303 g	121 mg
NaCl VWR 08L180005	100	0,186 g	0,093 g	37 mg

* Ajuster le pH de solution à 7,4

* Conditionner le tampon hoechst à 4 °C, DLC =15 jours

2) Solution hoechst (abris de la lumière)

Solution mère hoechst = 10 mg/ml dans l'eau de qualité biologie moléculaire (conditionné à 4 °C).

- ✓ Diluer la solution mère dans du tampon hoechst pour obtenir une solution fille 0,1 µg/ml, c'est-à-dire, 0,1 µl solution mère hoechst pour 10 ml tampon hoechst

✚ Préparation de la gamme d'ADN

Solution mère d'ADN du thymus de veau = 1 mg/ml (conserver dans le congélateur)

- ✓ Diluer la solution mère d'ADN dans de l'eau ADNase/RNase free pour obtenir une solution fille 10 µg/ml, donc 10 µl solution mère d'ADN pour 990 µl de l'eau ADNase/RNase free, 7 µl solution mère d'ADN pour 693 µl de l'eau ADNase/RNase free, 3,5 µl solution mère d'ADN pour 346,5 µl de l'eau ADNase/RNase free, Pour cette manip, nous prenons celui de 3,5 µl car la solution fille d'ADN totale est 325 µl (voir le Tableau 2)

Tableau 2

ADN (µg/ml)	0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,5	0,7	1
Volume de solution fille d'ADN (µl)	-	5	10	15	20	25	30	50	70	100
Volume tampon hoechst (µl)	100	95	90	85	80	75	70	50	30	-

- ✓ Préparer la gamme dans des eppendorf® RNase/DNase free et les placer dans la glace
- ✓ Ajouter dans chaque eppendorf® RNase/DNase free 900 µl de la solution hoechst à l'abri de la lumière, up and down pour bien mélanger la solution
- ✓ les mettre dans une plaque à fond noir, 200 µl/puit (triplicate)
- ✓ Lecture au spectrophotomètre après dépôt de la gamme
- ✓ $\lambda_{\text{excitation}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 458 \text{ nm}$
- ✓ Si la gamme est bien linéaire, procéder au dosage des échantillons

✚ Dosage de l'ADN des échantillons

- ✓ Ajouter 100 μ l de tampon de hoechst dans eppendorf[®] RNase/DNase free contenant le culot d'ADN
- ✓ Lyser les cellules par sonication 13 min
- ✓ Compléter eppendorf[®] RNase/DNase free à 1 ml avec la solution hoechst
- ✓ Lecture au spectrophotomètre après dépôt de la gamme, $\lambda_{\text{excitation}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 458 \text{ nm}$

Annexe-6 : Pourcentages d'atomes à l'ensemble de film de chitosane seul et chitosane mélangé aux nanoliposomes avant et après le traitement plasma.

	Echantillons	C	O	N	C-C/C-H	C-O	C=O	O-C=O	O=C	O-C O-H	C- N
Avant plasma	Chitosane seul	91,44	7,10	1,45	64,0	9,5	-	1,6	0,9	6,2	
	Cht+nsoja	85,05	13,76	0,64	53,0	14,7	-	2,9	1,5	8,6	
	Cht+ncolza	88,15	10,50	0,63	43,3	12,2	-	2,5	1,2	5,9	
	Cht+nsaumon	72,49	21,58	4,66	37,6	24,9	6,9	3,1	1,4	20,1	
Après plasma	Chitosane seul 0%N ₂ /100%H ₂	59,47	32,71	7,81	10,7	34,6	11,6	2,7	5,4	25,3	
	Chitosane seul 50%N ₂ /50%H ₂	57,53	31,73	10,74	11,6	30,9	12,2	2,8	6,2	24,4	
	Chitosane seul 88%N ₂ /12%H ₂	57,56	33,47	8,60	9,5	32,7	12,3	3,1	5,6	25,6	
	Chitosane seul 100%N ₂ /0%H ₂	65,38	28,04	6,45	22,6	29,3	10,8	2,6	6,4	20,0	
	Cht+nsoja 100%N ₂ /0%H ₂	76,06	18,29	4,80	52,9	11,0	5,7	6,4	3,9	10,4	
	Cht+ncolza 88%N ₂ /12%H ₂	79,86	14,72	5,18	57,9	10,8	5,1	6,0	2,4	8,2	
	Cht+nsaumon 100%N ₂ /0%H ₂	65,04	25,67	7,40	28,4	23,3	8,8	4,5	4,7	19,4	

Annexe-7 : Publications, communications orales & affiches.

Publications

Zhang, H. Y., Arab-Tehrany, E., Kahn, C. J. F., Ponçot, M., Linder, M., and Cleymand, F. (2012). Effects of nanoliposomes based on soya, rapeseed and fish lecithins on chitosan thin films designed for tissue engineering. *Carbohydr. Polym.* 88, 618–627.

Zhang, H. Y., Cleymand, F., Noël, C., Kahn, C. J. F., Linder, M., Dahoun, A., Henrion, G., and Arab-Tehrany, E. (2013). Effects of Ar–H₂–N₂ microwave plasma on chitosan and its nanoliposomes blend thin films designed for tissue engineering applications. *Carbohydr. Polym.* 93, 401–411.

Zhang, H. Y., Cleymand, F., Dostert, G., Menu, P., Arab Tehrany, E., and Velot, E. Physical, chemical and *in vitro* characterization of nanoliposomes/chitosan blend scaffolds for tissue engineering. *Soumise au Tissue Eng. Part A*.

Communications orales & affiches

Zhang, H. Y., Dostert, G., Arab-Tehrany, E., Menu, P., Velot, E., and Cleymand, F. (2014). Correlations between physical-chemistry properties and *in vitro* characterization of “green” nanoliposomes/chitosan blend scaffolds for tissue engineering (Berlin, Germany).

Zhang, H. Y., Arab-Tehrany, E., and Cleymand, F. (2013). Elaboration and characterization of chitosan fonctionnalized by nanoliposomes for tissue engineering applications (Xi’an, Chine).

Zhang, H. Y., Dostert, G., Arab-Tehrany, E., Menu, P., Velot, E., and Cleymand, F. (2013). Do nanoliposomes/chitosan blend scaffolds have cyto-friendly architectures for mesenchymal stem cells culture? (Grenoble, France).

Zhang, H. Y., Dostert, G., Arab-Tehrany, E., Menu, P., Velot, E., and Cleymand, F. (2013). *In vitro* characterization of nanoliposomes/chitosan blend scaffolds for tissue engineering (Séville, Espagne).

Zhang, H. Y., Arab-Tehrany, E., Dahoun, A., and Cleymand, F. (2012). Chitosan thin films functionalized by natural nanoliposomes and RF cold plasma treatment for tissue engineering application (Lausanne, Suisse).

Zhang, H. Y., Arab-Tehrany, E., Dahoun, A., and Cleymand, F. (2012). Élaboration, propriétés mécaniques et rhéologiques de films de chitosan contenant des nanoliposomes naturels pour des applications en ingénierie tissulaire (Montpellier, France).

Zhang, H. Y., Arab-Tehrany, E., Dahoun, A., and Cleymand, F. (2012). Étude par AFM en mode HarmoniXTM de films de chitosane fonctionnalisés par des nanoliposomes naturels pour des applications en ingénierie tissulaire (l’Abbaye de St Jacut de la Mer, France).

RÉFÉRENCE BIBLIOPGRAPHIQUE

- Abdelwahe, M.B.A. (2011). Mécanismes d'impregnation en milieu fibreux: modélisation et application à la mise en oeuvre des matériaux composites à fibres longues. Université du Havre.
- Ackman, R.G. (1998). Remarks on official methods employing boron trifluoride in the preparation of methyl esters of the fatty acids of fish oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* *75*, 541–545.
- Alessandri, J.-M., Guesnet, P., Vancassel, S., Denis, I., Langelier, B., and Lavalie, M. (2004). Fonctions biologiques des acides gras polyinsaturés dans les membranes nerveuses : une évolution des concepts. *Cah. Nutr. Diététique* *39*, 270–279.
- Arab Tehrany, E., Kahn, C.J.F., Baravian, C., Maherani, B., Belhaj, N., Wang, X., and Linder, M. (2012). Elaboration and characterization of nanoliposome made of soya; rapeseed and salmon lecithins: Application to cell culture. *Colloids Surf. B Biointerfaces* *95*, 75–81.
- Aravamudhan, A., Ramos, D.M., Nada, A.A., and Kumbar, S.G. (2014). Chapter 4 - Natural Polymers: Polysaccharides and Their Derivatives for Biomedical Applications. In *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*, S.G. Kumbar, C.T. Laurencin, and M. Deng, eds. (Oxford: Elsevier), pp. 67–89.
- Bangham, A.D., and Horne, R.W. (1964). Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.* *8*, 660–IN10.
- Bangham, A.D., Standish, M.M., and Watkins, J.C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* *13*, 238–IN27.
- Bartczak, Z., Galeski, A., Argon, A.S., and Cohen, R.E. (1996). On the plastic deformation of the amorphous component in semicrystalline polymers. *Polymer* *37*, 2113–2123.
- Bax, D.V., McKenzie, D.R., Weiss, A.S., and Bilek, M.M.M. (2009). Linker-free covalent attachment of the extracellular matrix protein tropoelastin to a polymer surface for directed cell spreading. *Acta Biomater.* *5*, 3371–3381.
- Baxter, A., Dillon, M., Anthony Taylor, K.D., and Roberts, G.A.F. (1992). Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* *14*, 166–169.
- Beachley, V., and Wen, X. (2010). Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. *Prog. Polym. Sci.* *35*, 868–892.
- Belhaj, N., Arab-Tehrany, E., and Linder, M. (2010). Oxidative kinetics of salmon oil in bulk and in nanoemulsion stabilized by marine lecithin. *Process Biochem.* *45*, 187–195.
- Belmonte, T., Pintassilgo, C.D., Czerwiec, T., Henrion, G., Hody, V., Thiebaut, J.M., and Loureiro, J. (2005). Oxygen plasma surface interaction in treatments of polyolefines. *Surf. Coat. Technol.* *200*, 26–30.
- Bhatia, S.K. (2010). *Biomaterials for Clinical Applications* (Sujata K. Bhatia).
- Bhattarai, N., Ramay, H.R., Chou, S.-H., and Zhang, M. (2006). Chitosan and lactic acid-grafted chitosan nanoparticles as carriers for prolonged drug delivery. *Int. J. Nanomedicine* *1*, 181–187.
- Bowey, K., Tanguay, J.-F., and Tabrizian, M. (2014). 2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine-based nanoliposomes as an effective delivery platform for 17 β -estradiol. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* *86*, 369–375.
- Box, G.E.P., and Wilson, K.B. (1992). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. In *Breakthroughs in Statistics*, (Springer), pp. 270–310.
- Brannon-Peppas, L., and Vert, M. (2000). Polylactic and polyglycolic acids as drug delivery carriers. In *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*, (New York.), pp. 99–130.
- Brown, B.N., Barnes, C.A., Kasick, R.T., Michel, R., Gilbert, T.W., Beer-Stolz, D., Castner, D.G., Ratner, B.D., and Badylak, S.F. (2010). Surface characterization of extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials* *31*, 428–437.

- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F., Argüelles-Monal, W., Desbrières, J., and Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer* 42, 3569–3580.
- Burkersroda, F. von, Schedl, L., and Göpferich, A. (2002). Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials* 23, 4221–4231.
- Canal, C., Gaboriau, F., Vílchez, A., Erra, P., Garcia-Celma, M^aJ., and Esquena, J. (2009). Topographical and Wettability Effects of Post-Discharge Plasma Treatments on Macroporous Polystyrene-Divinylbenzene Solid Foams. *Plasma Process. Polym.* 6, 686–692.
- Chansiri, G., Lyons, R.T., Patel, M.V., and Hem, S.L. (1999). Effect of surface charge on the stability of oil/water emulsions during steam sterilization. *J. Pharm. Sci.* 88, 454–458.
- Chen, C., Liang, B., Lu, D., Ogino, A., Wang, X., and Nagatsu, M. (2010). Amino group introduction onto multiwall carbon nanotubes by NH₃/Ar plasma treatment. *Carbon* 48, 939–948.
- Cheng, Y., Lu, J., Liu, S., Zhao, P., Lu, G., and Chen, J. (2014). The preparation, characterization and evaluation of regenerated cellulose/collagen composite hydrogel films. *Carbohydr. Polym.* 107, 57–64.
- Chichti, E., Henrion, G., Cleymand, F., Jamshidian, M., Linder, M., and Arab-Tehrany, E. (2013). Effects of Ar–N₂–O₂ Microwave Plasma on Poly-L-Lactic Acid Thin Films Designed for Tissue Engineering. *Plasma Process. Polym.* 10, 535–543.
- Coates, J. (2000). Interpretation of infrared spectra, a practical approach. *Encycl. Anal. Chem.* 10815–10837.
- Coonrod, D., Brick, M.A., Byrne, P.F., DeBonte, L., and Chen, Z. (2008). Inheritance of long chain fatty acid content in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Euphytica* 164, 583–592.
- Crini, G., Guibal, É., Morcellet, M., Torri, G., and Badot, P.-M. (2009). Chitine et chitosane. Préparation, propriétés et principales applications. In *Chitine et chitosane du biopolymère à l'application*, pp. 19–54.
- Cui, N.-Y., and Brown, N.M.D. (2002). Modification of the surface properties of a polypropylene (PP) film using an air dielectric barrier discharge plasma. *Appl. Surf. Sci.* 189, 31–38.
- D09 Committee (2004). Test Methods for Thickness of Solid Electrical Insulation (ASTM International).
- Delgado, A.V., González-Caballero, F., Hunter, R.J., Koopal, L.K., and Lyklema, J. (2007). Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *J. Colloid Interface Sci.* 309, 194–224.
- Derjaguin, B., Muller, V., and Toporov, Y. (1975). Effect of contact deformations on the adhesion of particles. *J. Colloid Interface Sci.* 53, 314–326.
- DIMETEX (2010). Etude des perspectives de développement des technologies textiles en ingénierie cellulaire et tissulaire. 1–29.
- Doehlert, D.H., and Klee, V.L. (1972). Experimental designs through level reduction of the d-dimensional cuboctahedron. *Discrete Math.* 2, 309–334.
- Domard, A. (2011). A perspective on 30 years research on chitin and chitosan. *Carbohydr. Polym.* 84, 696–703.
- Domard, A., and Rinaudo, M. (1983). Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* 5, 49–52.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317.
- Domszy, J.G., and Roberts, G.A.F. (1985). Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analysing chitosan. *Makromol. Chem.* 186, 1671–1677.

- Drelich, J., Fang, C., and White, C.L. (2002). Measurement of interfacial tension in fluid-fluid systems. *Encycl. Surf. Colloid Sci.* 3152–3166.
- Drury, J.L., and Mooney, D.J. (2003). Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Synth. Biomim. Polym.* 24, 4337–4351.
- Duarte, A.R.C., Mano, J.F., and Reis, R.L. (2010). Novel 3D scaffolds of chitosan–PLLA blends for tissue engineering applications: Preparation and characterization. *J. Supercrit. Fluids* 54, 282–289.
- Dupuis, D. (2008). *Mesure de la viscosité - Viscosimètres et rhéomètres.*
- Düzgüneş, N., and Nir, S. (1999). Mechanisms and kinetics of liposome–cell interactions. *Pharmacokinet. Liposomes Tumor Target.* 40, 3–18.
- Einstein, A. (1956). *Investigations on the Theory of the Brownian Movement* (R. FÜRTH).
- Febvre, M., and Pittinger, B. (2008). Le mode Harmonix™ : une nouvelle technique de microscopie champ proche. *Matér. Tech. hors série*, 1–6.
- Feller, S.E., Gawrisch, K., and MacKerell, A.D. (2002). Polyunsaturated Fatty Acids in Lipid Bilayers: Intrinsic and Environmental Contributions to Their Unique Physical Properties. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 318–326.
- Fernandes, L.L., Resende, C.X., Tavares, D.S., Soares, G.A., Castro, L.O., and Granjeiro, J.M. (2011). Cytocompatibility of chitosan and collagen-chitosan scaffolds for tissue engineering. *Polímeros* 21, 1–6.
- Fogelson, S.J., Ross, A., and Lobstein, O.E. (1954). A method for the quantitative determination of lysozyme activity in blood. *Am. J. Dig. Dis.* 21, 327–331.
- Freese, R., and Mutanen, M. (1997). Alpha-linolenic acid and marine long-chain n-3 fatty acids differ only slightly in their effects on hemostatic factors in healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 66, 591–598.
- Freier, T., Koh, H.S., Kazazian, K., and Shoichet, M.S. (2005). Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation. *Biomaterials* 26, 5872–5878.
- Galeski, A., Argon, A.S., and Cohen, R.E. (1991). Deconvolution of x-ray diffraction data to elucidate plastic deformation mechanisms in the uniaxial extension of bulk nylon 6. *Macromolecules* 24, 3945–3952.
- Garrett, R.H., and Grisham, C.M. (2000). *Biochimie (De Boeck Supérieur).*
- Gray, J.E., Norton, P.R., and Griffiths, K. (2003). Surface modification of a biomedical poly(ether)urethane by a remote air plasma. *Appl. Surf. Sci.* 217, 210–222.
- Grazia Calvagno, M., Celia, C., Paolino, D., Cosco, D., Iannone, M., Castelli, F., Doldo, P., and Fresta, M. (2007). Effects of Lipid Composition and Preparation Conditions on Physical-Chemical Properties, Technological Parameters and In Vitro Biological Activity of Gemcitabine-Loaded Liposomes. *Curr. Drug Deliv.* 4, 89–101.
- Griffiths, P.R., and Haseeth, J.A.D. (2007). *Fourier Transform Infrared Spectrometry* (John Wiley & Sons).
- Han, T., Nwe, N., Furuike, T., Tokura, S., and Tamura, H. (2012). Methods of N-acetylated chitosan scaffolds and its in vitro biodegradation by lysozyme. *J. Biomed. Sci. Eng.* 05, 15–23.
- Hankiewicz, J., and Swierczek, E. (1974). Lysozyme in human body fluids. *Clin. Chim. Acta* 205–209.
- Hay, E.D. (1991). *Cell Biology of Extracellular Matrix* (Springer Science & Business Media).
- He, Q., Gong, K., Ao, Q., Ma, T., Yan, Y., Gong, Y., and Zhang, X. (2013). Positive charge of chitosan retards blood coagulation on chitosan films. *J. Biomater. Appl.* 27, 1032–1045.

- Hegemann, D., Brunner, H., and Oehr, C. (2003). Plasma treatment of polymers for surface and adhesion improvement. *Ioniz. Radiat. Polym.* 208, 281–286.
- Hench, L.L., and Thompson, I. (2010). Twenty-first century challenges for biomaterials. *J. R. Soc. Interface* 7, S379–S391.
- Hirano, S., Tsuchida, H., and Nagao, N. (1989). N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis. *Biomaterials* 10, 574–576.
- Hody, V., Belmonte, T., Pintassilgo, C.D., Poncin-Epaillard, F., Czerwec, T., Henrion, G., Segui, Y., and Loureiro, J. (2006). Modification of Hexatriacontane by O₂-N₂ Microwave Post-Discharges. *Plasma Chem. Plasma Process.* 26, 251–266.
- Hubert, J. (2006). Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja – Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines. L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE.
- Huebsch, N., and Mooney, D.J. (2009). Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature* 462, 426–432.
- Ikeda, I., Wakamatsu, K., Inayoshi, A., Imaizumi, K., Sugano, M., and Yazawa, K. (1994). α -Linolenic, Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids Affect Lipid Metabolism Differently in Rats. *J. Nutr.* 124, 1898–1906.
- Inagaki, N., Narushima, K., and Lim, S.K. (2003). Effects of aromatic groups in polymer chains on plasma surface modification. *J. Appl. Polym. Sci.* 89, 96–103.
- Inagaki, N., Narushima, K., Hashimoto, H., and Tamura, K. (2007). Implantation of amino functionality into amorphous carbon sheet surfaces by NH₃ plasma. *Carbon* 45, 797–804.
- Ishihara, M., Fujita, M., Obara, K., Hattori, H., Nakamura, S., Nambu, M., Kiyosawa, T., Kanatani, Y., Takase, B., Kikuchi, M., *et al.* (2006). Controlled Releases of FGF-2 and Paclitaxel from Chitosan Hydrogels and their Subsequent Effects on Wound Repair, Angiogenesis, and Tumor Growth. *Curr. Drug Deliv.* 3, 351–358.
- Jańczuk, B., González-martín, M.L., and Bruque, J.M. (1996). Wettability of fluorite in the presence of an anionic and a non-ionic surfactant. *Can. Metall. Q.* 35, 17–21.
- Je, J.-Y., and Kim, S.-K. (2012). Chapter 7 - Chitosan as Potential Marine Nutraceutical. In *Advances in Food and Nutrition Research*, Se-Kwon Kim, ed. (Academic Press), pp. 121–135.
- Jesorka, A., and Orwar, O. (2008). Liposomes: Technologies and Analytical Applications. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 1, 801–832.
- Kabri, T., Arab-Tehrany, E., Belhaj, N., and Linder, M. (2011). Physico-chemical characterization of nano-emulsions in cosmetic matrix enriched on omega-3. *J. Nanobiotechnology* 9, 1–8.
- Kas, H.S. (1997). Chitosan: Properties, preparations and application to microparticulate systems. *J. Microencapsul.* 14, 689–711.
- Keeley, F.W., and Mecham, R. (2013). Evolution of Extracellular Matrix.
- Kim, I.-Y., Seo, S.-J., Moon, H.-S., Yoo, M.-K., Park, I.-Y., Kim, B.-C., and Cho, C.-S. (2008). Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnol. Adv.* 26, 1–21.
- Kofuji, K., Qian, C.-J., Nishimura, M., Sugiyama, I., Murata, Y., and Kawashima, S. (2005). Relationship between physicochemical characteristics and functional properties of chitosan. *Eur. Polym. J.* 41, 2784–2791.
- Koh, H.S., Yong, T., Chan, C.K., and Ramakrishna, S. (2008). Enhancement of neurite outgrowth using nano-structured scaffolds coupled with laminin. *Biomaterials* 29, 3574–3582.

- König, U., Nitschke, M., Pilz, M., Simon, F., Arnhold, C., and Werner, C. (2002). Stability and ageing of plasma treated poly(tetrafluoroethylene) surfaces. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 25, 313–324.
- Kral, M, Ogino, Akihisa, and Nagatsu, Masaaki (2008). Effect of Ar and N₂ Plasma Pretreatment with Biased Sample Holder on Amino Group Introduction Onto Polyethylene Sheet Treated by Ammonia Plasma. *Jpn. J. Appl. Phys.* 7346–7348.
- Kristiansen, A., Vårum, K.M., and Grasdalen, H. (1998). The interactions between highly de-N-acetylated chitosans and lysozyme from chicken egg white studied by ¹H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* 251, 335–342.
- Kumar, M.N., Muzzarelli, R.A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., and Domb, A.J. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem. Rev.* 104, 6017–6084.
- Kwok, D.Y., and Neumann, A.W. (1999). Contact angle measurement and contact angle interpretation. *Adv. Colloid Interface Sci.* 81, 167–249.
- Lai, W.-F., and Lin, M.C.-M. (2009). Nucleic acid delivery with chitosan and its derivatives. *J. Controlled Release* 134, 158–168.
- Langer, R. (2000). Tissue Engineering. *Mol. Ther.* 1, 12–15.
- Langer, R., and Peppas, N.A. (2003). Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology. *AIChE J.* 49, 2990–3006.
- Langer, R., and Vacanti, J.P. (1993). Tissue engineering. *Science* 260, 920–926.
- Law, J.M.S., Setiadi, D.H., Chass, G.A., Csizmadia, I.G., and Viskolcz, B. (2005). Flexibility of “Polyunsaturated Fatty Acid Chains” and Peptide Backbones: A Comparative ab Initio Study. *J. Phys. Chem. A* 109, 520–533.
- Lazaridou, A., and Biliaderis, C.G. (2002). Thermophysical properties of chitosan, chitosan–starch and chitosan–pullulan films near the glass transition. *Carbohydr. Polym.* 48, 179–190.
- Lecerf, J.-M. (2011). Les huiles végétales : particularités et utilités: Vegetable oils: Particularities and usefulness. *Médecine Mal. Métaboliques* 5, 257–262.
- Lee, K.Y., and Mooney, D.J. (2001). Hydrogels for Tissue Engineering. *Chem. Rev.* 101, 1869–1880.
- Lee, J.-Y., Nam, S.-H., Im, S.-Y., Park, Y.-J., Lee, Y.-M., Seol, Y.-J., Chung, C.-P., and Lee, S.-J. (2002). Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. *Proc. Tenth Int. Symp. Recent Adv. Drug Deliv. Syst.* 78, 187–197.
- Lendlein, A., Neffe, A.T., Pierce, B.F., and Vienen, J. (2011). Why are so few degradable polymeric biomaterials currently established in clinical applications? *Int. J. Artif. Organs* 34, 71–75.
- Leshem, Y.Y., Landau, E.M., and Deutsch, M. (1988). A Monolayer Model Study of Surface Tension-Associated Parameters of Membrane Phospholipids: Effect of Unsaturation of Fatty Acyl Tails. *J. Exp. Bot.* 39, 1679–1687.
- Lin, Y.-L., Jen, J.-C., Hsu, S., and Chiu, I.-M. (2008). Sciatic nerve repair by microgrooved nerve conduits made of chitosan-gold nanocomposites. *Surg. Neurol.* 70, *Supplement 1*, S9–S18.
- Linder, M., Fanni, J., and Parmentier, M. (2001). Enzyme-catalysed enrichment of n-3 polyunsaturated fatty acids of salmon oil: optimisation of reaction conditions : Lipids, fats, and oils: opportunities and responsibilities in the new century. In *OCL. Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, (Libbey-Eurotext), pp. 73–77.
- Lorin, A., Flore, C., Thomas, A., and Brasseur, R. (2004). Les liposomes: description, fabrication et applications. *Biotechnol Agron Soc Env.* 8, 163–176.

- Lu, G., Kong, L., Sheng, B., Wang, G., Gong, Y., and Zhang, X. (2007). Degradation of covalently cross-linked carboxymethyl chitosan and its potential application for peripheral nerve regeneration. *Eur. Polym. J.* *43*, 3807–3818.
- Lubarsky, G.V., Davidson, M.R., and Bradley, R.H. (2004). Elastic modulus, oxidation depth and adhesion force of surface modified polystyrene studied by AFM and XPS. *Surf. Sci.* *558*, 135–144.
- Luna, S.M., Silva, S.S., Gomes, M.E., Mano, J.F., and Reis, R.L. (2011). Cell Adhesion and Proliferation onto Chitosan-based Membranes Treated by Plasma Surface Modification. *J. Biomater. Appl.* *26*, 101–116.
- Lutolf, M.P., and Hubbell, J.A. (2005). Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotech* *23*, 47–55.
- Maherani, B. (2011). Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. *Curr. Nanosci.* *7*, 436–452.
- Maherani, B., Arab-tehrany, E., Kheirooloom, A., Reshetov, V., Stebe, M.J., and Linder, M. (2012). Optimization and characterization of liposome formulation by mixture design. *The Analyst* *137*, 773–786.
- Al-sayed mahmoud, K. (2007). Extraction, fractionnement et caractérisation des lipides polyinsaturés d'oeufs de la truite arc-en-ciel (*ncorhynchus mykiss*). doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Malheiro, V.N., Caridade, S.G., Alves, N.M., and Mano, J.F. (2010). New poly(ϵ -caprolactone)/chitosan blend fibers for tissue engineering applications. *Acta Biomater.* *6*, 418–428.
- Mano, J.F., Silva, G.A., Azevedo, H.S., Malafaya, P.B., Sousa, R.A., Silva, S.S., Boesel, L.F., Oliveira, J.M., Santos, T.C., Marques, A.P., *et al.* (2007). Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *J. R. Soc. Interface* *4*, 999–1030.
- Masuoka, K., Ishihara, M., Asazuma, T., Hattori, H., Matsui, T., Takase, B., Kanatani, Y., Fujita, M., Saito, Y., Yura, H., *et al.* (2005). The interaction of chitosan with fibroblast growth factor-2 and its protection from inactivation. *Biomaterials* *26*, 3277–3284.
- Mazerolles, G., Mathieu, D., Phan-tan-luu, R., and Siouffi, A.M. (1989). Computer-assisted optimization with nemrod software. *J. Chromatogr. A* *485*, 433–451.
- Mi, F.-L., Shyu, S.-S., Wong, T.-B., Jang, S.-F., Lee, S.-T., and Lu, K.-T. (1999). Chitosan–polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anticancer drug. II. Effect of pH-dependent ionic crosslinking or interpolymer complex using tripolyphosphate or polyphosphate as reagent. *J. Appl. Polym. Sci.* *74*, 1093–1107.
- Mi, F.-L., Tan, Y.-C., Liang, H.-F., and Sung, H.-W. (2002). In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. *Biomaterials* *23*, 181–191.
- Miya, M., Iwamoto, R., Yoshikawa, S., and Mima, S. (1980). I.r. spectroscopic determination of CONH content in highly deacylated chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* *2*, 323–324.
- Monchaux, E. (2007). Développement de surface bioactives pour contrôler le comportement cellulaire-utilisation de puces de polymères et de biomolécules. thèse. Université de Sherbrooke.
- Monzack, E., Rodriguez, K., McCoy, C., Gu, X., and Masters, K. (2011). Natural Materials in Tissue Engineering Applications. In *Biomaterials for Tissue Engineering Applications*, J. Burdick, and R. Mauck, eds. (Springer Vienna), pp. 209–241.
- Moore, G.K., and Roberts, G.A.F. (1978). Study on the acetylation of chitosan. MIT Sea Grant Rep. *78*, 421.
- Morra, M., Occhiello, E., and Garbassi, F. (1989). Contact angle hysteresis on oxygen plasma treated polypropylene surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* *132*, 504–508.

- Moser, E. M., Gilliéron, D., and Henrion, G. (2010). Durable anti-fogging effect and adhesion improvement on polymer surfaces. *Eur. Phys. J. - Appl. Phys.* 1311–1312.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Moulder, J.F., Stickle, W.F., Sobol, P.E., and Bomben, K.D. (1995). *Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy* (Minnesota: Jill Chastain & Roger C. King, Jr.).
- Mucha, M., and Pawlak, A. (2005). Thermal analysis of chitosan and its blends. *Thermochim. Acta* 427, 69–76.
- Munier, R.L., and De bièvre, C. (1979). *Chromatographie de surface en phase liquide sur feuille et sur couche mince*.
- Muzzarelli, R.A.A., and Muzzarelli, C. (2005). Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Sciences. In *Polysaccharides I*, T. Heinze, ed. (Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 151–209.
- Muzzarelli, R.A.A., Greco, F., Busilacchi, A., Sollazzo, V., and Gigante, A. (2012). Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: A review. *Carbohydr. Polym.* 89, 723–739.
- Naderi, H., Matin, M.M., and Bahrami, A.R. (2011). Review paper: Critical Issues in Tissue Engineering: Biomaterials, Cell Sources, Angiogenesis, and Drug Delivery Systems. *J. Biomater. Appl.* 26, 383–417.
- Nandi, S.K., Kundu, B., and Basu, D. (2013). Protein growth factors loaded highly porous chitosan scaffold: A comparison of bone healing properties. *Mater. Sci. Eng. C* 33, 1267–1275.
- Narushima, K., Yamashita, N., Fukuoka, M., Inagaki, N., Isono, Y., and Islam, M.R. (2007). Surface Modifications of Polyester Films by Ammonia Plasma. *Jpn. J. Appl. Phys.* 46, 4238.
- Neto, C.G.T., Giacometti, J.A., Job, A.E., Ferreira, F.C., Fonseca, J.L.C., and Pereira, M.R. (2005). Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. *Carbohydr. Polym.* 62, 97–103.
- Nicolas, J., Mura, S., Brambilla, D., Mackiewicz, N., and Couvreur, P. (2013). Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chem. Soc. Rev.* 42, 1147–1235.
- Okamoto, Y., Yano, R., Miyatake, K., Tomohiro, I., Shigemasa, Y., and Minami, S. (2003). Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydr. Polym.* 53, 337–342.
- Owens, D.K., and Wendt, R.C. (1969). Estimation of the surface free energy of polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* 13, 1741–1747.
- Park, J.H., Wasilewski, C.E., Almodovar, N., Olivares-Navarrete, R., Boyan, B.D., Tannenbaum, R., and Schwartz, Z. (2012). The responses to surface wettability gradients induced by chitosan nanofilms on microtextured titanium mediated by specific integrin receptors. *Biomaterials* 33, 7386–7393.
- Pecora, R. (1985). *Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy* (Springer Science & Business Media).
- Pillai, C.K.S., Paul, W., and Sharma, C.P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Prog. Polym. Sci.* 34, 641–678.
- Ponçot, M. (2009). *Comportements thermomécaniques de polymères chargés selon différents chemins de déformation et traitements thermiques*. Université de Lorraine.
- Quijada-Garrido, I., Iglesias-González, V., Mazón-Arechederra, J.M., and Barrales-Rienda, J.M. (2007). The role played by the interactions of small molecules with chitosan and their transition temperatures. Glass-forming liquids: 1, 2, 3-Propantriol (glycerol). *Carbohydr. Polym.* 68, 173–186.

- Rambjør, G.S., Wølen, A.I., Windsor, S.L., and Harris, W.S. (1996). Eicosapentaenoic acid is primarily responsible for hypotriglyceridemic effect of fish oil in humans. *Lipids* 31, S45–S49.
- Rivoal, J., and Frétygny, C. (2005). Microscopie à force atomique (AFM).
- Ruste, J. (2013). Microscopie électronique à balayage - Principe et équipement.
- Sabnis, S., and Block, L.H. (1997). Improved infrared spectroscopic method for the analysis of degree of N-deacetylation of chitosan. *Polym. Bull.* 39, 67–71.
- Safinia, L., Datan, N., Höhse, M., Mantalaris, A., and Bismarck, A. (2005). Towards a methodology for the effective surface modification of porous polymer scaffolds. *Biomaterials* 26, 7537–7547.
- Sahin, O. (2007). Harnessing bifurcations in tapping-mode atomic force microscopy to calibrate time-varying tip-sample force measurements. *Rev. Sci. Instrum.* 78, 103707.
- Sahin, O., and Erina, N. (2008). High-resolution and large dynamic range nanomechanical mapping in tapping-mode atomic force microscopy. *Nanotechnology* 19, 445717.
- Saldeen, T., Wallin, R., and Marklinder, I. (1998). Effects of a small dose of stable fish oil substituted for margarine in bread on plasma phospholipid fatty acids and serum triglycerides. *Nutr. Res.* 18, 1483–1492.
- Saltzman, W.M., and Kyriakides, T.R. (2014). Cell interactions with polymers. *Princ. Tissue Eng.* 3, 385–406.
- Samuels, R.J. (1981). Solid state characterization of the structure of chitosan films. *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.* 19, 1081–1105.
- Sannan, T., Kurita, K., Ogura, K., and Iwakura, Y. (1978). Studies on chitin: 7. I.r. spectroscopic determination of degree of deacetylation. *Polymer* 19, 458–459.
- Sarra-Bournet, C., Turgeon, S., Mantovani, D., and Laroche, G. (2006a). A study of atmospheric pressure plasma discharges for surface functionalization of PTFE used in biomedical applications. *J. Phys. Appl. Phys.* 39, 3461.
- Sarra-Bournet, C., Turgeon, S., Mantovani, D., and Laroche, G. (2006b). Comparison of Atmospheric-Pressure Plasma versus Low-Pressure RF Plasma for Surface Functionalization of PTFE for Biomedical Applications. *Plasma Process. Polym.* 3, 506–515.
- Schechter, E. (1997). *Biochimie et biophysique des membranes: Aspects structuraux et fonctionnels.*
- Schipper, N.M., Vårum, K., and Artursson, P. (1996). Chitosans as Absorption Enhancers for Poorly Absorbable Drugs. 1: Influence of Molecular Weight and Degree of Acetylation on Drug Transport Across Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells. *Pharm. Res.* 13, 1686–1692.
- Shah, N.H., Railkar, A.S., Chen, F.C., Tarantino, R., Kumar, S., Murjani, M., Palmer, D., Infeld, M.H., and Malick, A.W. (1993). A biodegradable injectable implant for delivering micro and macromolecules using poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) copolymers. *J. Controlled Release* 27, 139–147.
- Shigemasa, Y., Saito, K., Sashiwa, H., and Saimoto, H. (1994). Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins. *Int. J. Biol. Macromol.* 16, 43–49.
- Synnytsya, A., Grafova, M., Slepicka, P., Gedeon, O., and Synnytsya, A. (2012). Modification of chitosan–methylcellulose composite films with meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin. *Biomacromolecules.*
- Tanuma, H., Saito, T., Nishikawa, K., Dong, T., Yazawa, K., and Inoue, Y. (2010). Preparation and characterization of PEG-cross-linked chitosan hydrogel films with controllable swelling and enzymatic degradation behavior. *Carbohydr. Polym.* 80, 260–265.
- Temenoff, J.S., and Mikos, A.G. (2008). *Biomaterials: The Intersection of Biology and Materials Science* (Pearson/Prentice Hall).

- Temmerman, E., Akishev, Y., Trushkin, N., Leys, C., and Verschuren, J. (2005). Surface modification with a remote atmospheric pressure plasma: dc glow discharge and surface streamer regime. *J. Phys. Appl. Phys.* *38*, 505.
- Torchilin, V.P. (2006). Multifunctional nanocarriers. Part. *Nanomedicines* *58*, 1532–1555.
- Tranchant, J. (1996). *Chromatographie en phase gazeuse*.
- Uhrich, K.E., Gupta, A., Thomas, T.T., Laurencin, C.T., and Langer, R. (1995). Synthesis and Characterization of Degradable Poly(anhydride-co-imides). *Macromolecules* *28*, 2184–2193.
- Velema, J., and Kaplan, D. (2006). Biopolymer-Based Biomaterials as Scaffolds for Tissue Engineering. In *Tissue Engineering I*, K. Lee, and D. Kaplan, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 187–238.
- Vert, M. (2007). Polymeric biomaterials: Strategies of the past vs. strategies of the future. *Polym. Biomed. Appl.* *32*, 755–761.
- Vesel, A., and Mozetic, M. (2012). Surface modification and ageing of PMMA polymer by oxygen plasma treatment. *Vacuum* *86*, 634–637.
- Vognild, E., Elvevoll, E.O., Brox, J., Olsen, R.L., Barstad, H., Aursand, M., and Østerud, B. (1998). Effects of dietary marine oils and olive oil on fatty acid composition, platelet membrane fluidity, platelet responses, and serum lipids in healthy humans. *Lipids* *33*, 427–436.
- Wallach, J. (1995). *Les liposomes — Aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*: By J Delattre, P Couvreur, F Puisieux, J R Philippot and F Schuber, coordinateurs. pp 266. Editions INSERM, 1993. 310 F ISBN 2-85206-891-5. *Biochem. Educ.* *23*, 78–78.
- Wang, L., Dormer, N.H., Bonewald, L.F., and Detamore, M.S. (2010). Osteogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stromal cells in polyglycolic acid scaffolds. *Tissue Eng. Part A* *16*, 1937–1948.
- Wang, Y., Yin, S., Ren, L., and Zhao, L. (2009). Surface characterization of the chitosan membrane after oxygen plasma treatment and its aging effect. *Biomed. Mater.* *4*, 035003.
- Wilke, C.R., and Chang, P. (1955). Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions. *AIChE J.* *1*, 264–270.
- Yamaguchi, I., Itoh, S., Suzuki, M., Sakane, M., Osaka, A., and Tanaka, J. (2003). The chitosan prepared from crab tendon I: the characterization and the mechanical properties. *Biomaterials* *24*, 2031–2036.
- Yang, T.-L. (2011). Chitin-based Materials in Tissue Engineering: Applications in Soft Tissue and Epithelial Organ. *Int. J. Mol. Sci.* *12*, 1936–1963.
- Yang, T.-L., and Young, T.-H. (2009). Chitosan cooperates with mesenchyme-derived factors in regulating salivary gland epithelial morphogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* *13*, 2853–2863.
- Yang, L., Chen, J., Guo, Y., and Zhang, Z. (2009). Surface modification of a biomedical polyethylene terephthalate (PET) by air plasma. *Appl. Surf. Sci.* *255*, 4446–4451.
- Zarzycki, R., and Modrzejewska, Z. (2003). Use of chitosan in medicine and biomedical engineering. *Polim. Med.* *33*, 47–58.
- Zhang, H.Y., Arab Tehrany, E., Kahn, C.J.F., Poñçot, M., Linder, M., and Cleymand, F. (2012). Effects of nanoliposomes based on soya, rapeseed and fish lecithins on chitosan thin films designed for tissue engineering. *Carbohydr. Polym.* *88*, 618–627.
- Zhang, H.Y., Cleymand, F., Noël, C., Kahn, C.J.F., Linder, M., Dahoun, A., Henrion, G., and Arab-Tehrany, E. (2013). Effects of Ar–H₂–N₂ microwave plasma on chitosan and its nanoliposomes blend thin films designed for tissue engineering applications. *Carbohydr. Polym.* *93*, 401–411.

Zhu, H., Ji, J., Barbosa, M.A., and Shen, J. (2004). Protein electrostatic self-assembly on poly(DL-lactide) scaffold to promote osteoblast growth. *J. Biomed. Mater. Res.* *71B*, 159–165.

Zhu, L.-Y., Lin, D.-Q., and Yao, S.-J. (2010). Biodegradation of polyelectrolyte complex films composed of chitosan and sodium cellulose sulfate as the controllable release carrier. *Carbohydr. Polym.* *82*, 323–328.

Zhu, N., Cooper, D., Chen, X.-B., and Niu, C.H. (2013). A study on the in vitro degradation of poly(l-lactide)/chitosan microspheres scaffolds. *Front. Mater. Sci.* *7*, 76–82.

Zong, Z., Kimura, Y., Takahashi, M., and Yamane, H. (2000). Characterization of chemical and solid state structures of acylated chitosans. *Polymer* *41*, 899–906.

Zucker, D., and Barenholz, Y. (2010). Optimization of vincristine–topotecan combination — Paving the way for improved chemotherapy regimens by nanoliposomes. *J. Controlled Release* *146*, 326–333.

Résumé

Ce travail porte sur la fonctionnalisation en volume et/ou en surface et la caractérisation multi-échelle de films minces de chitosane utilisés en ingénierie tissulaire. L'ajout des nanoliposomes à base de lécithine naturelle (végétale ou marine) et un traitement plasma sont employés pour réaliser ces deux fonctionnalisations. De nombreuses analyses des caractéristiques physico-chimiques et « structurales » de films minces ont montré que lorsqu'on ajoute 10 % de nanoliposomes dans les films de chitosane, l'hydrophobicité de la surface s'améliore de 18 à 36 %, ce fait est attribué à la présence de composants polaires. La cristallinité est légèrement augmentée ; à 37 °C, le module d'Young diminue de 6 GPa environ jusqu'à près de 4 GPa ; aucune nouvelle liaison ne se crée entre le chitosane et les nanoliposomes ; une diminution de degré de déacétylation est observée, qui pourrait être associée à la conformation des nanoliposomes ajoutés en volume aux films de chitosane.

Le traitement plasma a réussi à modifier la structure de surface du chitosane seul et du chitosane mélangé aux nanoliposomes par greffe de groupements actifs (groupes amine, C-O, COOH, -OH). En revanche, dans notre cas, les liaisons hydrogène entre les groupes polaires créés par le traitement plasma peuvent être éliminées partiellement après un temps donné, ce qui limite l'application du traitement.

Ensuite, des études préliminaires sur la biocompatibilité *in vitro* et la biodégradabilité *in vitro* sont réalisées pour les films de chitosane et du chitosane mélangé aux nanoliposomes. Les cellules souches mésenchymateuses sont utilisées pour l'étude de la première, et une solution de PBS contenant 10 mg/L de lysozyme pour la seconde. Les propriétés physico-chimiques des films de chitosane mélangé aux nanoliposomes marines, leur faible cytotoxicité aux cellules et leur stabilité dans la solution de PBS contenant du lysozyme leur permettent d'être utilisés comme matrice de support dans le domaine de la médecine régénérative.

Mots clés : chitosane, nanoliposomes, fonctionnalisation en volume, traitement plasma, biocompatibilité *in vitro*, biodégradabilité *in vitro*

Abstract

This work focused on functionalized chitosan thin films in the bulk and/or on the surface by nanoliposomes based on natural lecithin (plant and marine) and plasma treatment. Various techniques were used for physicochemical properties analysis of functionalized thin films. The results showed that by adding the nanoliposomes into the chitosan scaffold, the surface wettability of thin films increased from 18 % to 36 %. The crystallinity degree was slightly improved in blend thin films. Any new bond was determined by fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), which confirmed that there is no chemical interaction between the nanoliposomes and chitosan. The Young's modulus of blend thin films decreased from 6 GPa to 5 GPa. The morphological, nanomechanical properties and adhesion force of each scaffold system determined by Scanning Probe Microscopy (HarmoniX™ mode) showed that the fish nanoliposomes/chitosan thin film had the most similar properties compared to the pure chitosan thin film.

The surface of chitosane films and nanoliposomes/chitosane blend films were modified by the plasma treatment. Functional groups (amine groups, C-O, COOH, -OH) are grafted onto the surface enhancing thus the surface energy of the films. But the hydrogen bonds between the polar groups introduced by the treatment can be destroyed after a given time; the author proposed that the functionalization in the bulk by adding of nanoliposomes provided more stable and greater possibility of new materials producing than the functionalization at the surface by plasma treatment for potential tissue engineering application.

Then, *in vitro* biocompatibility preliminary study was carried using human mesenchymal stem cells (hMSCs); and *in vitro* biodegradability study was tested in the phosphate buffered saline (PBS) mixed with 10 mg/L lysozyme. The films of chitosan functionalized by salmon nanoliposomes showed more interesting as matrix extracellular for regenerative medicine applications because of their physico-chemical properties, low cytotoxicity and the stability inside the PBS and lysozyme solutions.

Keywords: chitosan, nanoliposomes, functionalization in volume, plasma treatment, *in vitro* biocompatibility, *in vitro* biodegradability