



HAL
open science

Optimisation physico-chimique de films fonctionnalisés pour des applications cardio-vasculaires

Jordan Beurton

► **To cite this version:**

Jordan Beurton. Optimisation physico-chimique de films fonctionnalisés pour des applications cardio-vasculaires. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2021. Français. NNT : 2021LORR0139 . tel-03405464

HAL Id: tel-03405464

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03405464>

Submitted on 27 Oct 2021

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>

École Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Jordan BEURTON**

Optimisation physico-chimique de films fonctionnalisés pour des applications cardiovasculaires

Le 17 septembre 2021

Membres du jury :

Rapporteurs :	M. Nicolas BLANCHEMAIN	PR, U1008 INSERM, Faculté de Pharmacie de Lille, Lille
	Mme Sophie DEMOUSTIER-CHAMPAGNE	PR, IMCN/BSMA, Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve
Examineurs :	Mme Corine GERARDIN	DR, Institut Charles Gerhardt, UMR 5253 CNRS, Université de Montpellier, Montpellier
	M. Gregory FRANCIUS	DR, LCPME UMR 7564 CNRS, Université de Lorraine, Nancy
	Mme Ariane BOUDIER	PR, EA 3452 CITHEFOR Université de Lorraine, Nancy, Directrice de thèse
	M. Philippe LAVALLE	DR, U 1121 INSERM, Université de Strasbourg, Strasbourg, Co-directeur de thèse
Membres invités :	M. Benoit FRISCH	DR, UMR7199 CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg
	M. Raphaël DUVAL	PR, L2CM UMR 7053 CNRS, Université de Lorraine, Nancy

EA 3452 CITHEFOR : Cibles Thérapeutiques et Expertise Préclinique du Médicament, Campus Brabois Santé, 9 avenue de la Forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre Les Nancy

INSERM U1121 : Biomatériaux et bioingénierie, Centre de Recherche en Biomédecine de Strasbourg, 1 rue Eugène Boeckel, 67084 Strasbourg

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont égaillé mes journées durant ces trois ans et qui ont contribué de près ou de loin à l'évolution de ma thèse.

Ariane Boudier et Philippe Lavallo respectivement directrice et co-directeur de thèse, merci pour votre implication, votre disponibilité, votre soutien sans failles surtout durant les périodes les plus compliqués. Merci de m'avoir laissé exprimer ma curiosité et ma créativité toujours accompagnées de vos conseils avisés.

Nicolas Blanchemain et Sophie Demoustier-Champagne, merci d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Corine Gerardin et Gregory Francius, merci d'avoir accepté d'être les examinateurs de ce travail.

Benoit Frisch et Raphaël Duval, merci d'avoir suivi l'évolution de mes travaux. Merci pour vos conseils et votre objectivité sans détour.

Igor Clarot, merci pour votre écoute malicieuse et bienveillante du fameux : « alors en fait, j'ai une idée ... ».

Margaux, ma binôme de thèse, merci pour tous ces moments que je résumerai par : « on n'aura pas fait avancer la science mais on se sera bien amusés ».

Tous mes amis doctorants de CITHEFOR et de l'INSERM 1121, je vous souhaite le meilleur et bon courage pour la suite.

Tous les autres membres de CITHEFOR et de l'INSERM 1121 et en particulier Arnaud pour tes conseils en mécanique et ton partage enthousiaste de connaissances, Thomas pour tes desserts tirés du sac, Christine, Lauriane et Claire pour vos sourires et votre bonne humeur quotidienne.

Nos différents collaborateurs, de Nancy et Strasbourg (Julien Perrin et Béatrice Heurtault) pour leur expertise et leur contribution aux travaux de ce projet.

Tous les étudiants qui ont contribué à ce travail, votre aide est appréciée à sa juste valeur.

Enfin tous mes proches, merci pour votre soutien.

Table des matières

Liste des figures	5
Liste des tableaux	8
Liste des abréviations	9
Introduction générale	11
Chapitre 1 : Etat de l'art	17
1.1 Contexte physiopathologique des maladies cardiovasculaires ischémiques et rôle physiologique du NO.	18
1.2 Film multicouches	20
1.3 Nanoparticules d'or	22
1.4 Article 1: Nitric oxide delivering surfaces: <i>An overview of functionalization strategies and efficiency progress</i>	24
1.5 Biocompatibilité sanguine	72
Chapitre 2 : Optimisation et caractérisation d'un revêtement formant un réservoir en monoxyde d'azote.	75
2.1 Développement d'une stratégie analytique pour la caractérisation de films multicouches immobilisant des AuNP.	77
Article 2: <i>Analytical strategy for studying the formation and stability of multilayered films containing gold nanoparticles</i>	81
Conclusions de l'article 2 :	113
2.2. Fonctionnalisation par NO	114
2.2.1 Fonctionnalisation des nanoparticules avant leur immobilisation	116
2.2.2 Conclusions et perspectives	124
Chapitre 3 : Biocompatibilité des AuNP et des films multicouches immobilisant des AuNP	126
3.1 Etude de l'hémocompatibilité d'un panel de nanoparticules d'or selon leur ligand de surface.	127

Article 3 : Design of surface ligands for blood compatible gold nanoparticles: effect of charge and binding energy	129
Conclusion de l'article 3 :	166
3.2 Biocompatibilité des films multicouches immobilisant des AuNP	167
3.2.1 Introduction	167
3.2.2 Matériel & Méthode	173
3.2.2.1 Préparation des films multicouches	173
3.2.2.2 Caractérisation des films multicouches et étude de l'adsorption protéique par Microbalance à Cristal de Quartz (QCM).	174
3.2.2.3 Hémolysse induite	176
3.2.2.5 Etude de l'activité métabolique de fibroblastes murins au contact des surfaces	180
3.2.2.6 Quantification de l'or libéré par les films multicouches immobilisant des AuNP	181
3.2.2.7 Culture et étude de la viabilité des cellules endothéliales HUVEC.	182
3.2.3 Résultats et discussion	183
3.2.3.1 Caractérisation des surfaces pégyllées	183
3.2.3.2 Hémolysse	187
3.2.3.3 Cytotoxicité	190
3.2.3.4 Quantification de l'or	191
3.2.3.5 Coagulation	193
3.2.3.6 Viabilité des cellules endothéliales au contact des surfaces.	198
3.2.4 Conclusion et perspectives	205
Conclusion générale et perspectives	207
Bibliographie	211
Annexes	218
Annexe 1 : Article 4 : Long-lasting and controlled antioxidant property of immobilized gold nanoparticles for intelligent packaging	219

Liste des figures

Figure 1 : Organisation du film multicouche développé pour recouvrir le DMI cardiovasculaire (stent).	13
Figure 2 : Description du phénomène entraînant la thrombose et la resténose après implantation du stent dans une artère.	19
Figure 3 : Méthodologie de construction des films multicouches tripartis ([polycation-AuNP-polyanion]) immobilisant les AuNP.	22
Figure 4 : Synthèse d’AuNP stabilisées par les ions citrate.	23
Figure 5 : Principe de la formation des films multicouches immobilisant des AuNP par dip coating et méthodes analytiques permettant de les caractériser après formation (spectrophotométrie visible et chromatographie liquide haute performance) ou de suivre chaque étape de la construction du film (QCM, ECZ).	80
Figure 6 : Représentation schématique des AuNP@DHLA-GSH	114
Figure 7 : Stratégie de fonctionnalisation des AuNP avant immobilisation.	115
Figure 8 : Processus de synthèse en deux temps des AuNP@DHLA-GSH à partir des AuNP-citrate.	116
Figure 9 : Dépôts successifs des AuNP@DHLA-GSH (15 cycles) sur une monocouche de polycation PAH suivi par la nitrosation de la surface par incubation overnight dans une solution de GSNO (10^{-2} M).	118
Figure 10 : Absorbance ($n=1$) au λ max de films [PAH-AuNP-PAA] ₃ et PAH ₁ -AuNP ₁₅ immobilisant des AuNP-citrate (orange) et des AuNP@DHLA-GSH (gris).	119
Figure 11 : Fonctionnalisation d’AuNP portant des fonctions amines primaires par le réactif de Traut.	120
Figure 12 : AuNP-PAH et AuNP@Cystéamine portant des amines primaires pouvant être fonctionnalisées par le réactif de Traut.	120
Figure 13 : AuNP-PAH-SH obtenues par la fonctionnalisation des AuNP-PAH avec le réactif de Traut.	122
Figure 14 : Schéma représentant l’organisation des films multicouches avec une dernière couche de copolymère à blocs (-b-) ou greffé (-g-) PAA-b/g-PEG.	169
Figure 15 : Structure des copolymères PAA-b/g-PEG utilisées dans cette étude.	170
Figure 16 : Schématisation de la préparation des films multicouches pégylés à la surface d’un cristal de quartz de QCM.	174

Figure 17 : A Principe de la mesure de fragilité membranaire par la méthode Osmocell® B Courbe représentative de la variation de la transmittance en fonction de la concentration en NaCl de la solution d'incubation de GR. _____	178
Figure 18 : Exemple de thrombinogramme enregistré lors de l'étude la cinétique d'activation de la thrombine _____	179
Figure 19 : Exemple de caractérisation de la construction des films multicouches « pégylés » par QCM. _____	183
Figure 20 : Densités moyennes de masses déposées (n=3) de différents copolymères PAA-PEG déposés à la surface des films (ng/cm ²) et estimées par expérimentation QCM. _____	185
Figure 21 : Mesure de la densité de masse adsorbée d'albumine (BSA) 0,4 g/L et (B) de sérum de veau foetal (SVF) à 10 % (V/V) sur les films multicouches pégylés ou non, construits à la surface d'un cristal de quartz. _____	186
Figure 22 : Cinétique d'hémolyse induite au contact des matériaux « pégylés » ou non déterminée par quantification spectrophotométrique de l'hémoglobine. _____	189
Figure 23 : Mesure de l'activité métabolique (n=3) des fibroblastes murin NIH3T3 au contact des films immobilisant des AuNP par la méthode à l'Alamar Blue à J1 (bleu), J3 (orange) et J7 (gris). _____	191
Figure 24 : Quantification de l'or libéré par les films (n=3). _____	193
Figure 25 : Cinétique d'activation de la thrombine avec 5 pM de facteur tissulaire(A) et avec 1 pM (B). _____	196
Figure 26 : Mesure de l'activité métabolique de 5 x 10 ⁴ cellules endothéliales humaines (HUVEC) ensemencées au contact des surfaces immobilisant des AuNP (n=3 pour chaque surface) par la méthode à l'Alamar Blue à J1 (bleu), J3 (orange), J5 (gris) J7 (vert). _____	199
Figure 27 : Mesure de l'activité métabolique de 10 ⁵ cellules endothéliales humaines (HUVEC) ensemencées au contact des surfaces immobilisant des AuNP (n=3 pour chaque surface) par la méthode à l'Alamar Blue à J1 (bleu), J3 (orange), J5 (gris) J7 (vert). _____	200
Figure 28 : Etude de l'activité métabolique (n=3 pour chaque surface) des cellules endothéliales humaines (HUVEC) en fonction de la composition des films multicouches et de l'ajout d'un donneur de NO. _____	202
Figure 29 : Etude de l'influence de la composition du milieu (en pourcentage de sérum de veau foetal (SVF) avec ou sans les suppléments Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS) et Héparine (Hep)) et de la concentration d'un ajout unique de GSNO (5,15 et 45 µM) sur l'activité métabolique des cellules endothéliales cultivées sur des lamelles de verre (n=3). _____	203

Figure 30 : Etude de l'influence d'ajouts successifs de GSNO (0,5 ;2 et 5 μ M toutes les 12 h) sur l'activité métabolique des cellules endothéliales cultivées sur des lamelles de verre (n=3).

204

Liste des tableaux

Tableau 1 : Evolution des caractéristiques physico-chimiques (n=3) des AuNP au cours de leur fonctionnalisation par les ligands DHLA et GSH	117
Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques (n=3) des AuNP portant des fonctions amines primaires (AuNP-PAH et AuNP @Cystéamine).	121
Tableau 3 : Bilan de la stratégie de fonctionnalisation des nanoparticules par un thiol réduit avant leur immobilisation au sein des films.	123
Tableau 4 : Copolymère à blocs PAA-b-PEG utilisé dans cette étude (fournis par Polymer Source, Canada).	172
Tableau 5 : Copolymère greffé PAA-g-PEG utilisé dans cette étude (fournis par Polymer Source, Canada).	172
Tableau 6 : Paramètres issus de l'exploitation du thrombinogramme (Figure 25 B) réalisé avec 1 pM de facteur tissulaire. Les valeurs présentées sont exprimées en pourcentage par rapport aux résultats obtenus pour la condition témoin plasma pauvre en plaquette sans contact avec les matériaux	197

Liste des abréviations

AuNP : Nanoparticules d'or

BSA : Bovine Serum Albumine

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

Cyst : Cystéamine

DAN : 2,3-DiAminoNaphtalène

Dh : Diamètre Hydrodynamique

DHLA : Acide α -dihydro-lipoïque

DLS : Dynamic Light Scattering

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMI : Dispositif Médicale Implantable

ECGS : Endothelial Cell Growth Supplement

ECZ : Electrophorèse Capillaire de Zone

eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase

EOF : Electro-Osmotic Floc

GR : Globules Rouges

GSH : Glutathion

GSNO : S-Nitrosoglutathion

Hep : Héparine

HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells

LOQ : Limit Of Quantification

NO : Nitric oxide

NONOate : *N*-Diazeniumdiolate

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAA : Poly(Acide Acrylique)

PAH : Poly(Allylamine Hydrochloride)

PBS : Phosphate Buffer Saline

PEG : Poly(Ethylene Glycol)

PPP : Plasma Pauvre en Plaquettes

PSS : Poly(styrène sulfonate)

QCM : Quartz Cristal Microbalance

RSe : Composé organique sélénié

RSH : Composé organique thiolé

RT-PCR : Reverse Transcription -Polymerase Chain Reaction

RSNO : Composé organique nitrosé

SNAP : *S*-Nitroso-*N*-acétyl-pénicillamine

SNO : fonctions *S*-nitrosothiol

UV : Ultra Violet

Introduction générale

Ce projet de thèse financé par la Région Grand Est, s'inscrit dans le contexte des maladies cardiovasculaires ischémiques nécessitant l'implantation d'un dispositif médical (DM) cardiovasculaire (endoprothèses vasculaires ou stents, valves cardiaques par exemple). Bien que le bénéfice thérapeutique apporté par ces dispositifs médicaux implantables (DMI) ne soit plus à démontrer¹, leur action se limite souvent à un apport mécanique, c'est-à-dire maintenir le vaisseau ouvert dans le cas d'un stent par exemple, sans pour autant apporter une réponse médicamenteuse plus complète, ciblant les troubles physiopathologiques associés. De plus, ces dispositifs sont associés sur le long terme à un risque élevé de thrombose et/ou de resténose². La thrombose est l'obstruction partielle ou totale d'un vaisseau. La resténose correspond à la diminution d'au moins 50 % du diamètre luminal artérielle par rapport au diamètre après pose d'un stent². Contrairement à la thrombose qui est un événement brusque, la resténose est phénomène progressif prenant plusieurs semaines³. En dépit des innovations apportées dans la qualité de leur surface (type de métal ou polymère employé)⁴, les utilisations ont montré une efficacité thérapeutique à court mais pas à long terme en raison du risque induit de thrombose et de resténose. Dans le cadre de ce projet de thèse, le développement de DMI libérant un médiateur physiologique participant à l'homéostasie vasculaire sur une longue durée, le monoxyde d'azote (NO), doit améliorer leur tolérance vasculaire et limiter la survenue des effets secondaires⁵. L'objectif de ce projet repose ainsi sur le design de surface de DMI. Le revêtement développé doit permettre au DMI recouvert de libérer du NO, de manière contrôlée. Pour cela, un film multicouche composé de polymères et de nanoparticules d'or (AuNP) fonctionnalisées par des donneurs de NO de type *S*-nitrosothiols (RSNO) est développé, depuis la phase de fonctionnalisation de la surface jusqu'à son évaluation biologique en termes de biocompatibilité et d'efficacité thérapeutique. Les nanoparticules d'or incluses dans le film doivent permettre d'augmenter le rendement de greffage en donneur de NO au sein du film afin de constituer un réservoir conséquent en NO. Le film multicouche permettra de contrôler la

libération du principe actif en créant une barrière limitant la diffusion d'espèces capables de libérer NO à partir des RSNO (cations métalliques, molécules portant une fonction thiol de faible masse moléculaire, réducteurs physiologiques...). Enfin, sur la couche externe du dispositif, en interaction directe avec le compartiment sanguin, du poly(éthylène glycol) (PEG) est ajouté pour favoriser la biocompatibilité du revêtement ⁶. La stratégie développée au travers de ce projet de thèse est représentée par la figure 1.

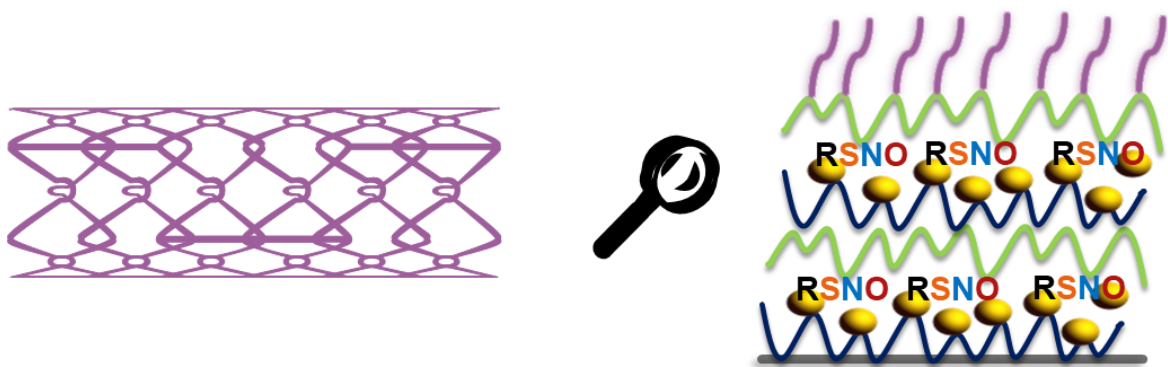


Figure 1 : Organisation du film multicouche développé pour recouvrir le DMI cardiovasculaire (stent). Le film multicouche de polyélectrolytes positif (bleu) et négatif (vert) incorporant des AuNP fonctionnalisés par un donneur de NO (RSNO) ; la dernière couche du film est composée de PEG (violet)

En amont de ce projet, un certain nombre de résultats ont permis d'apporter la preuve de faisabilité sur différents points (synthèse des AuNP^{7,8} et leur fonctionnalisation par des précurseurs de RSNO ⁹, construction de films polymériques multicouches immobilisant des AuNP et premiers essais de biocompatibilité ¹⁰).

Ce manuscrit organisé en trois chapitres, s'inscrit dans la poursuite de ces travaux. Le premier chapitre offre une vision générale de la littérature permettant d'appréhender la problématique de ce projet et de définir les concepts qui seront développés dans la suite du manuscrit. Dans ce chapitre un accent particulier a été mis sur les matériaux à viser biomédicales pour libérer ou

générer du NO. Ce point a fait l'objet d'une revue de la littérature qui sera prochainement soumise (article 1: *Nitric oxide delivering surfaces: An overview of functionalization strategies and efficiency progress*).

Le deuxième chapitre est centré sur la création des films multicouches servant de réservoir en NO. Il s'articule en deux parties.

Dans un premier temps, la construction de films modèles intégrant des nanoparticules non fonctionnalisées a été menée. Le but était d'optimiser la conception de films multicouches enrichis en AuNP en utilisant une stratégie analytique composée de plusieurs méthodes complémentaires. À partir des films intégrant les 3 constituants (polycation/AuNP chargé négativement/polyanion) deux paramètres principaux ont été abordés :

- la nature du polycation assurant l'ancrage des AuNP au sein du film
- la nature et la concentration du sel utilisé dans le tampon pour la construction du film.

Les exigences pour définir les meilleures conditions reposaient sur le compromis entre la quantité d'AuNP piégées et la stabilité du film. En effet, pour les futures applications biomédicales, le matériau créé doit permettre l'ajout d'une forte quantité de principe actif et aussi résister aux contraintes mécaniques (flux sanguin, contractions musculaires, ...) rencontrées par les dispositifs médicaux. Ces travaux ont conduit à la publication d'un article dans le journal *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (article 2 : *Analytical strategy for studying the formation and stability of multilayered films containing gold nanoparticles*) décrivant une méthodologie analytique afin d'étudier la stabilité des films multicouches et leur enrichissement en AuNP.

Dans un second temps, les travaux présentés dans ce chapitre s'intéressent à l'apport du principe actif (NO) au sein des films multicouches. La stratégie développée reposait sur la fonctionnalisation des AuNP avant leur inclusion dans les films. Les résultats présentés ont

permis la création de surfaces intégrant du NO avec une quantité similaire à celle déjà rapportée dans la littérature. Cependant, cette étude est restée incomplète car les quantités de principe actif introduites dans les films étaient inférieures à la quantité cible ($6 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) permettant d'envisager une activité thérapeutique sur le long terme.

Enfin, le troisième chapitre suit également une description en deux temps qui exposent premièrement, la biocompatibilité d'AuNP colloïdales pré-fonctionnalisées puis la biocompatibilité des films multicouches immobilisant des AuNP. Les stratégies de fonctionnalisation des AuNP développées dans le chapitre 2 ont permis la création d'un panel de nanoparticules présentant des ligands de surface variés en termes de charge et d'énergie d'interaction pour le cœur d'or des AuNP. L'hémocompatibilité des différentes AuNP en fonction de leur chimie de surface a été explorée vis-à-vis des constituants majoritaires du compartiment sanguin (protéines circulantes et globules rouges (GR)). L'ensemble de ces travaux a abouti à la rédaction d'un article, paru dans l'*International Journal of Pharmaceutics*, proposant les caractéristiques d'un ligand de surface favorisant l'hémocompatibilité des AuNP (article 3 : *Design of surface ligands for blood compatible gold nanoparticles : effect of charge and binding energy*).

La seconde partie présente les travaux menés sur la biocompatibilité des films multicouches. L'ajout de PEG au niveau de la dernière couche des films a été envisagé pour limiter l'interaction de cette surface avec le compartiment sanguin. L'adsorption des protéines plasmatiques sur les surfaces « pégyliées » a été étudiée, leur impact sur les GR, sur la cascade de la coagulation et sur la viabilité de deux types cellulaires ont aussi été considérés. Des difficultés de culture cellulaire n'ont pas permis de mener tous les travaux à terme. Cependant, ils se poursuivent actuellement.

Ce mémoire se termine par une conclusion générale récapitulant les points clés de ce travail qui sont principalement :

- Le développement d'une méthode analytique de caractérisation et d'optimisation des films multicouches immobilisant des AuNP
- La création d'un panel d'AuNP fonctionnalisables par le NO
- L'étude de l'hémocompatibilité des AuNP colloïdales et des films multicouches immobilisant des AuNP

Enfin, les perspectives visant à résoudre les limites de la fonctionnalisation par le NO et les pistes permettant de poursuivre l'étude de la biocompatibilité y seront aussi développées.

Chapitre 1 : Etat de l'art

1.1 Contexte physiopathologique des maladies cardiovasculaires ischémiques et rôle physiologique du NO.

Dans le monde, en 2019, d'après l'organisation mondiale de la santé (OMS), la première cause de mortalité était représentée par les maladies cardiovasculaires ischémiques, responsables de 16 % des décès dans le monde ¹¹. Depuis 2000, c'est cette pathologie qui a connu la plus forte augmentation du nombre de décès, avec une hausse de plus de 2 millions pour atteindre 8,9 millions de décès en 2019. Chaque année en France, 300 000 personnes souffrent d'ischémies (obstruction partielle ou totale d'un vaisseau, soit au niveau cérébral, soit au niveau du myocarde) ce qui entraîne l'utilisation d'un dispositif médical implantable (DMI) dédié. Parmi ces patients, environ 200 000 subissent une intervention chirurgicale afin de leur implanter un stent (endoprothèse vasculaire de forme tubulaire) visant à rétablir la circulation sanguine ¹². Malgré cela, près de 20 % des patients recevant le DMI décèdent des suites de l'ischémie et/ou de ses conséquences dans les minutes, heures ou jours qui vont suivre ¹². De plus, les ischémies cardiaques ou cérébrales en plus des conséquences et du coût direct, ont des répercussions importantes sur la qualité de vie : dépendance vis-à-vis d'un tiers, handicap physique ce qui entraîne un surcoût indirect pour la société ¹³. Même s'il existe un gain en termes de survie pour les patients après l'implantation d'un stent, des phénomènes de thrombose et/ou de resténose apparaissent dans 16 % à 42 % des cas au niveau du site d'implantation du DM impliquant le recours à un nouveau geste chirurgical ².

Des paramètres interconnectés jouent un rôle important dans le développement de la thrombose et de la resténose au niveau du site d'implantation du DMI. Si on prend l'exemple des complications liées à l'implantation de stents, on peut observer ⁵:

- des dommages de l'endothélium
- une adsorption protéique initiant un phénomène de coagulation
- une activation plaquettaire suivie d'une agrégation

- une activation leucocytaire
- une hyperprolifération des cellules musculaires lisses.

Ces phénomènes entraînent une thrombose et une resténose dont le mécanisme d'apparition est représenté par la figure 2.

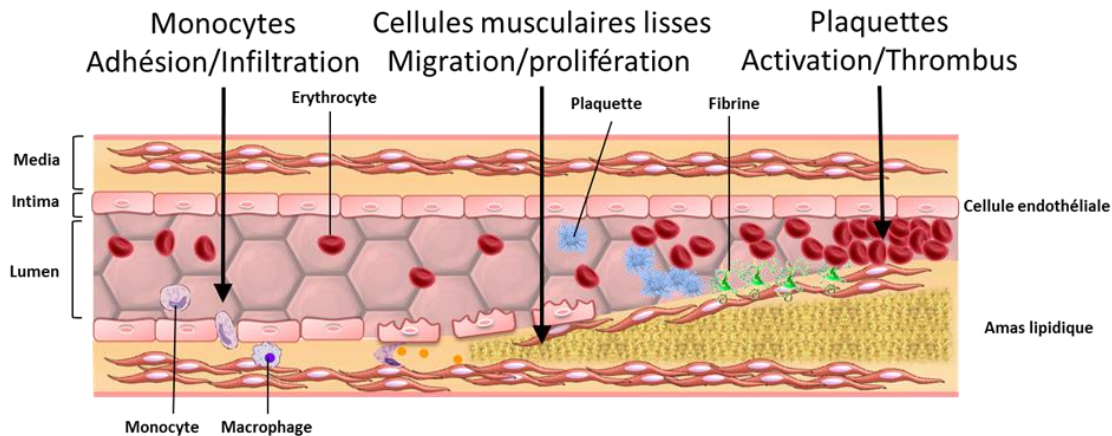


Figure 2 : Description du phénomène entraînant la thrombose et la resténose après implantation du stent dans une artère.

Pour éviter cela, des innovations récentes de ces DMI ont été développées :

- modification de leur surface : utilisation de nouveaux alliages, utilisation de polymères innovants ou de matériaux biodégradables ¹⁴⁻¹⁶,
- développement de dispositifs libérant des principes actifs (molécules antiprolifératives comme le paclitaxel, le sirolimus ou l'évérolimus pour les DMI déjà commercialisés et des protéines ou des acides nucléiques pour ceux en cours de développement ¹⁷)

Toutefois, ces matériaux ou revêtements ne sont pas tous commercialisés et/ou ne résolvent pas tous les problèmes : les lésions endothéliales et les troubles sanguins sont encore présents car la seule cible thérapeutique des molécules associées aux DMI est l'inhibition de l'hyperprolifération des cellules musculaires lisses.

Le monoxyde d'azote, NO, dans cette indication semble être le meilleur candidat puisqu'il induit ⁵:

- une vasodilatation basale ;

- une prévention du phénomène de thrombose ;
- une inhibition de l'activation et de l'agrégation plaquettaire ;
- une inhibition de l'activation des leucocytes ;
- un contrôle de la prolifération des cellules musculaires lisses ;
- une ré-endothélialisation *via* une prolifération des cellules endothéliales.

Ces actions bénéfiques sont possibles si NO est libéré de manière prolongée dans le temps (> 6 semaines) à une concentration correspondant à celle produite lors de sa biosynthèse par la *Nitric Oxide Synthase* endothéliale (eNOS) (concentration nM)¹⁸. En raison de sa structure chimique (NO est une espèce radicalaire) sa demi-vie est très courte (inférieure à 1 s)¹⁹. En conséquence, afin d'atteindre cet objectif, un revêtement adapté doit être développé : ceci constitue l'objectif de ce projet.

Dans la littérature, plusieurs travaux traitent du développement d'une surface capable de générer ou libérer du NO. Cela va être développé dans ce chapitre par le biais d'une revue de la littérature (article 1 en préparation : *Nitric oxide delivering surfaces: An overview of functionalization strategies and efficiency progress*)

1.2 Film multicouches

Les films multicouches sont des revêtements présentant un grand intérêt dans le domaine des dispositifs médicaux. Ils sont composés d'assemblage de couches successives de polyélectrolytes de charges opposées auto-assemblés par des liaisons électrostatiques. Ils sont construits par une méthode de dépôts successifs en couche par couche décrite par Decher *et al*²⁰. La surface à revêtir est immergée de façon successive dans une solution de polyélectrolytes cationiques puis anioniques, entre chaque dépôt de polymère le substrat est rincé dans un tampon salin. Lors de chaque dépôt une quantité de polymère est adsorbée sur la surface en induisant une inversion de la charge totale de la surface. L'étape de rinçage par le tampon permet d'éliminer l'excédent de polyélectrolytes présents en solution et les chaînes faiblement

adsorbées en surface. Cette méthode permet la construction contrôlée de films dont l'épaisseur peut varier de quelques Ångström à plusieurs micromètres sur une large variété de substrat. Dans le domaine biomédical, ces films permettent de conférer à une surface des propriétés nouvelles ²¹ telles qu'une activité antibactérienne (limitation de la prolifération bactérienne) ²², une résistance à l'adsorption protéique ^{23,24} ou à l'inverse promouvoir l'adhésion cellulaire ²⁵. Plus récemment, les films multicouches ont été utilisés en tant que réservoir *via* l'inclusion de principes actifs. Cependant, ces films présentent certaines limites en termes de capacité de stockage et de libération de médicaments à long terme ²⁶. Pour surmonter ce problème, deux méthodes peuvent être appliquées ou même couplées. La première correspond à une modification de l'organisation des films par l'optimisation des conditions d'assemblage ²¹ (facteurs externes : pH, température, concentration en sel...) ou en ajustant leur composition par l'ajout de couches polymériques barrières permettant une libération progressive du médicament ²⁷. La seconde méthode est réalisée par l'enrichissement des films avec des nanoparticules représentant des plateformes pour augmenter la capacité de ce réservoir en médicaments. Ceux-ci seront greffés sur la surface des nanoparticules avant le chargement de celles-ci dans les films. En plus de la fonction d'éluion de principe actif, l'inclusion de nanoparticules dans des films multicouches a également été utilisée pour conférer aux films au moins une partie des propriétés de ces objets :

- une activité antibactérienne par l'ajout de nanoparticules d'argent ^{28,29}
- une modification des propriétés mécaniques du film ³⁰
- des propriétés magnétiques grâce à des particules ferromagnétiques formant des plateformes de théranostiques ³¹
- une activité antioxydante portée par un film immobilisant des nanoparticules d'or ³²,
(article 4, en annexe issus de mes travaux de Master 2 : *Long-lasting and controlled*

antioxidant property of immobilized gold nanoparticles for intelligent packaging paru dans le journal *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*).

Dans le cadre de ce projet, les AuNP ont aussi été piégées à l'intérieur de films polyélectrolytes multicouches (Figure 3) pour le développement d'un matériau biocompatible ¹⁰. Ces particules ont été choisies pour leur grande capacité à être greffées avec des principes pharmaceutiques actifs ³³, ce qui permettrait la formation d'un réservoir d'une forte dose de médicaments.

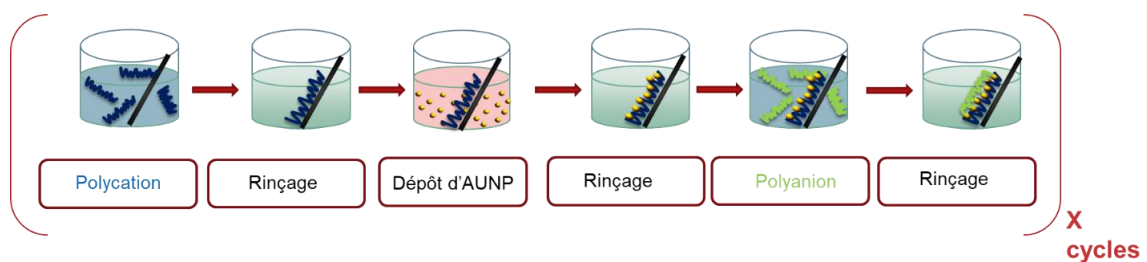


Figure 3 : Méthodologie de construction des films multicouches tripartis ([polycation-AuNP-polyanion]) immobilisant les AuNP.

1.3 Nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or (AuNP) sont des nanomatériaux dont les 3 dimensions sont à l'échelle nanométrique et le plus souvent de forme sphérique. Elles sont synthétisées classiquement, par la réduction d'or ionique (Au^{3+}) sous un état redox 3 en or au nombre d'oxydation nul (Au^0) par un réducteur fort (borohydrure de sodium, NaBH_4) en présence d'un stabilisant, le plus souvent des ions citrate ^{34,8,35} (Figure 4).

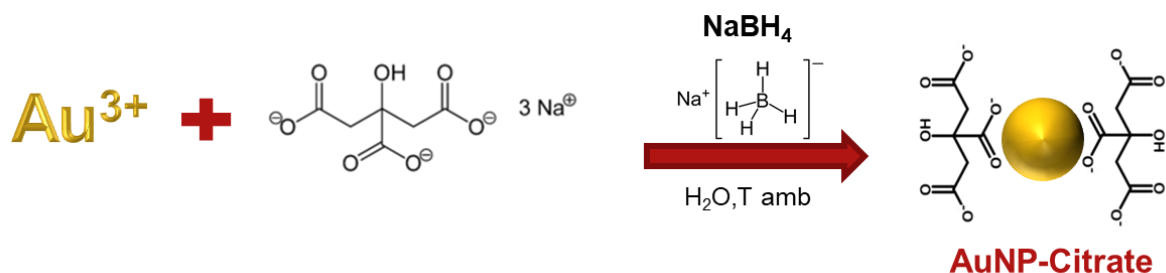


Figure 4 : synthèse d'AuNP stabilisées par les ions citrate à partir d'or ionique Au³⁺ réduit par un réducteur fort (NaBH₄) en nanoparticules d'or sphérique au nombre d'oxydation nul (Au⁰).

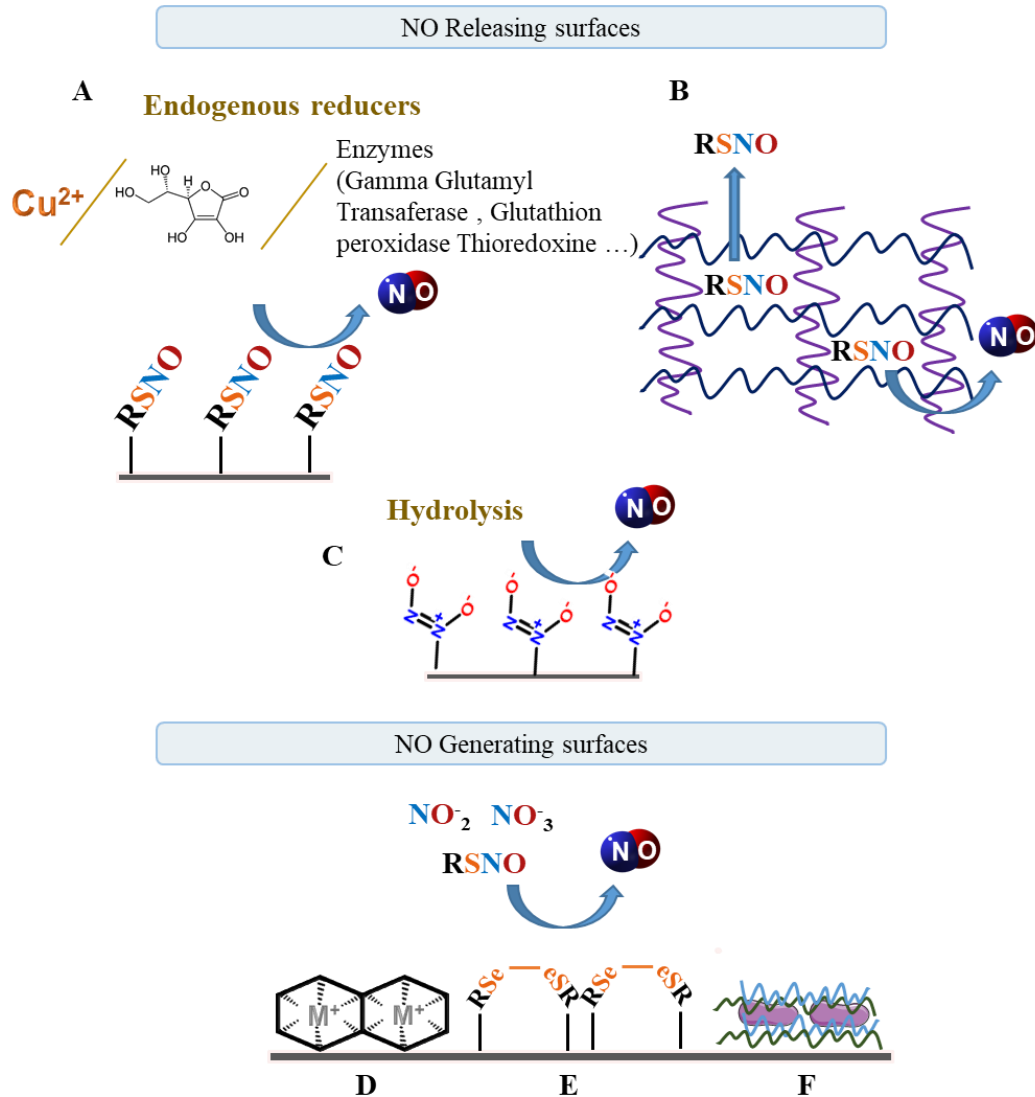
Sous cette forme nanoparticulaire, l'or acquiert des propriétés physico-chimiques que ne possède pas l'or macroscopique à l'état métallique³⁶. La réactivité des AuNP est principalement conditionnée par leur taille et leur forme ainsi que par l'espèce chimique intervenant dans leur stabilisation. Les ions citrate développant des interactions de faible énergie avec le cœur or³⁷ peuvent être échangés par un ligand de meilleure affinité comme une amine ou un thiol³⁸. Cette méthode de synthèse est souvent le point de départ de méthodes de fonctionnalisation plus complexe visant à greffer un principe actif en surface des AuNP, par exemple, une méthode de fonctionnalisation des AuNP par le glutathion (GSH) a été développée au sein du laboratoire CITHEFOR⁹.

1.4 Article 1: Nitric oxide delivering surfaces: An overview of functionalization strategies and efficiency progress

L'article 1 est une revue de la littérature offrant une vue d'ensemble des stratégies de fonctionnalisation de biomatériaux libérant au générant le NO

Cet article sera prochainement finalisé et soumis

Graphical abstract :



Introduction

Drug release surfaces are of a particular interest in the biomedical field. They are developed to obtain a localized and controlled delivery of therapeutic molecules. The biomolecule delivery overcomes the limitations associated with the metabolism and distribution of sensitive active ingredients such as peptides or nucleic acids.^[1] Among all of the surfaces, those able to release nitric oxide (NO) are extensively studied due to the pleiotropic effect of this diatomic compound. This article will emphasize on surfaces releasing and/or generating NO. This molecule is an important gasotransmitter involved in many physiological and pathological phenomena. It is a gaseous radical species with a short half-life^[2] of about 1 to 3 s limiting its range of action to about 100 μm from its production site.^[3] NO has oxidative and/or reductive capacities leading to many essential reactions in the organism. The main by-products of NO are described in **Figure 1**. The gain of an electron leads to the nitroxyl anion NO^- . In the presence of oxygen and water, NO undergoes successive oxidations leading to the formation of nitrite (NO_2^-) and nitrate ions (NO_3^-). NO also reacts with the superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) to form the peroxynitrite anion ONOO^- , a reactive nitrogen species responsible for nitrosative stress.^[4] We refer the reader to the review written by Ford and Miranda for a more precise vision of the reactivity and fate of NO and its derivatives in physiological condition.^[5]

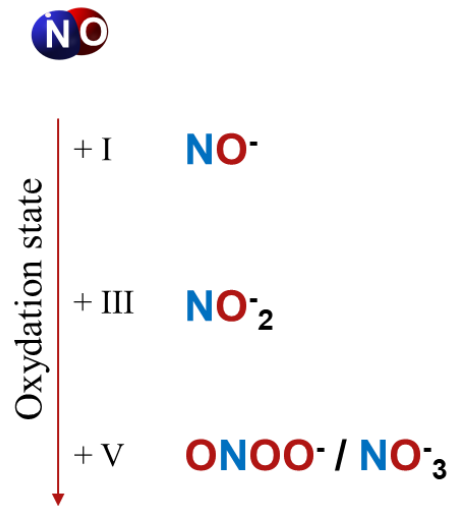


Figure 1. NO main byproducts obtained through successive oxidation in physiological conditions.

The reactivity and physiological effects of NO depend on its concentration and site of production (**Figure 2**). At high concentration ($> 1 \mu\text{M}$) the main reaction is nitration corresponding to the addition of an $-\text{NO}_2$ group. Classically this reaction occurs between the peroxy nitrite anion and the tyrosine residue of a protein. The formation of nitrotyrosine induces a modification of the tertiary structure of proteins leading to an alteration of their function.^[6] This nitrosating species can also induce DNA damages.^[7] NO antimicrobial property relies on this nitrosative and oxidative stress induction. NO action leads to the disruption of vital cellular functions or structure. Such antibiotic agent is particularly interesting because i) it allows the targeting of a large strains of bacteria; ii) NO is also able to diffuse through a biofilm and finally iii) its wide range of targets is less susceptible to induce resistance.^[8]

In physiological situations, at low concentrations ($\approx \text{nM}$) and when produced in a regulated and transient manner, NO participates in the maintenance of vascular homeostasis,^[9] in the regulation of platelet aggregation,^[10] in the inhibition of monocyte adhesion,^[11] smooth muscle cells contraction and proliferation^[12,13] and endothelial cells proliferation.^[14] These effects are mediated by a nitrosylation reaction that occurs with the coordination centers of transition metals such as iron, copper, zinc... The interaction between NO and a metal occurs mainly in metalloprotein-dependent signaling phenomena. The majority of the physiological effects of NO comes from the interaction of NO with the heme iron of guanylate cyclase^[15] which activates this enzyme and promotes the conversion of GTP to GMP_c . This NO- GMP_c signaling pathway is of major importance by modulating the activity of several protein kinases.^[16] Between these two concentrations, the NO produced by the organism mainly reacts through S-nitrosation. It corresponds to the reaction between a thiol functional group (RSH) and NO resulting in the formation of S-nitrosated species (*i.e.* S-nitrosothiol RSNO). Firstly, *in vivo*, thiol groups of cysteine amino-acid residues are often involved in catalytic or redox activities. A known example corresponds to the cysteine residue of endothelial NO Synthase (eNOS),^[17]

its *S*-nitrosation induces a negative autoregulation of NO production. Lastly, a part of the produced NO is added on low molecular mass RSNO (*e.g.* *S*-nitrosoglutathione, GSNO) or it can also react with proteins to form *S*-nitrosoproteins, both are the physiological forms of NO storage. GSNO is considered as the main form of intracellular NO reservoir. While, in the blood stream, NO is mainly carried by the *S*-nitrosoalbumin (AlbNO) obtained through the nitrosation of albumin free cysteine. AlbNO act as a NO carrier over the whole blood compartment.^[18]

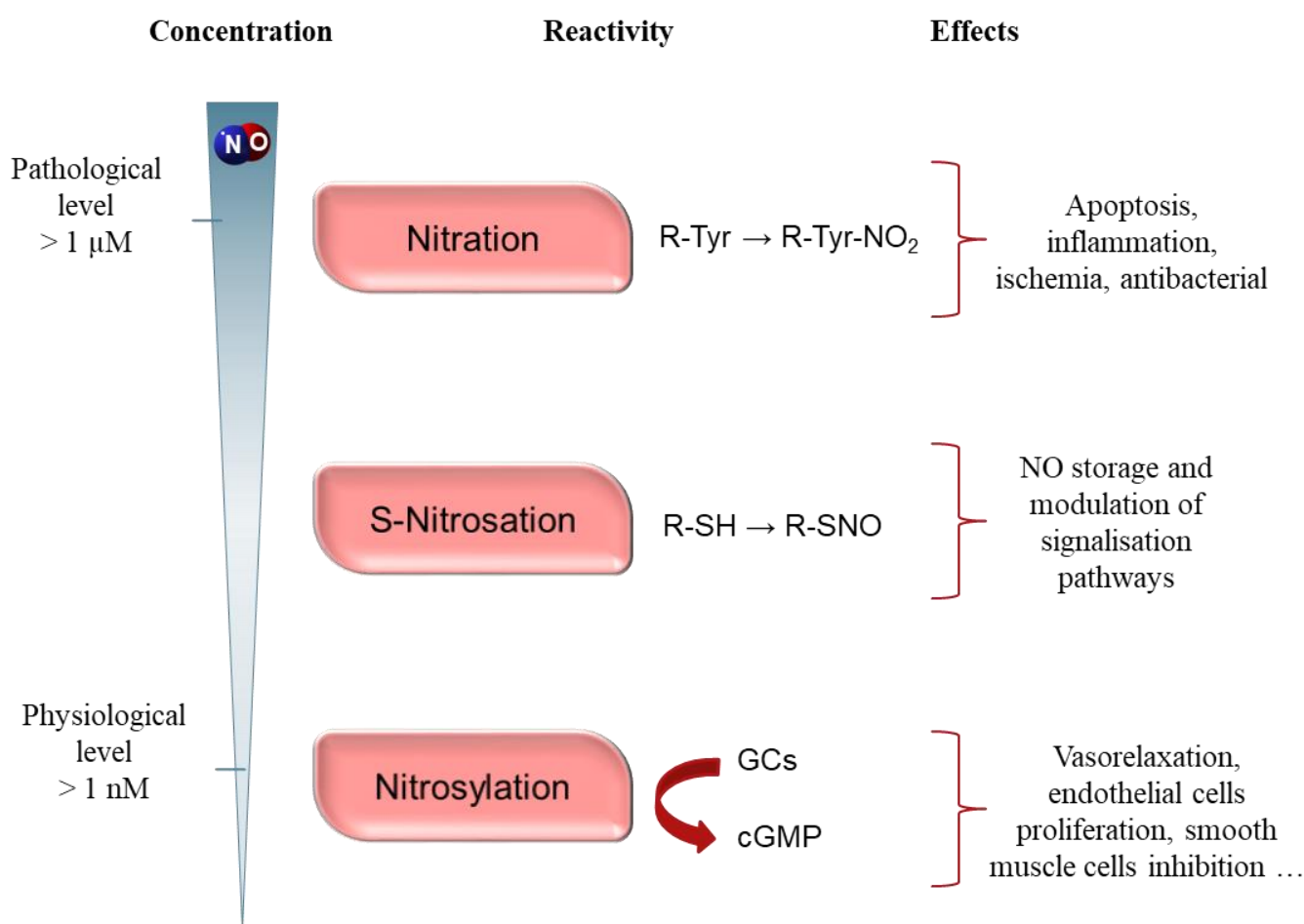
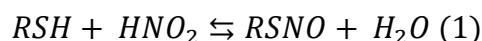


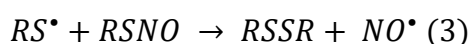
Figure 2. Reactions and physio-pathological effects involving NO in the organism as a function of its concentration.

Numerous works have been carried out to develop NO-based prodrugs for therapeutic use. Two families of molecules are of a particular interest. RSNO represents a judicious choice for the development of therapy to supplement NO deficiency. Indeed, beyond their capacity to bring NO to the organism, they are not toxic, do induce neither oxidative nor nitrosative stresses, nor

tolerance. In the lab, they are often synthesized through the reaction between reduced thiols with nitrous acid (**Equation 1**) in water or using tert-butyl nitrite in organic solvent.



The main mechanism resulting in RSNO denitrosation is the homolysis of the S-NO bond (**Equation 4**)



This weak sulfur nitrogen bond can be cleaved by other triggers such as metallic ions (*e.g.* Cu^{2+} via Cu^+), endogenous organic reducers (*e.g.* ascorbate) or enzymes (*e.g.* gamma-glutamyl transferase or protein disulfide-isomerase)

The second structures of interest are compounds containing a *N*-diazoniumdiolate function (NONOate). They are obtained by the reaction between a primary or a secondary amine with NO. NONOates have the advantage to potentially release two molecules of NO by hydrolysis of the function^[19] (depending on the structure and the physicochemical conditions).

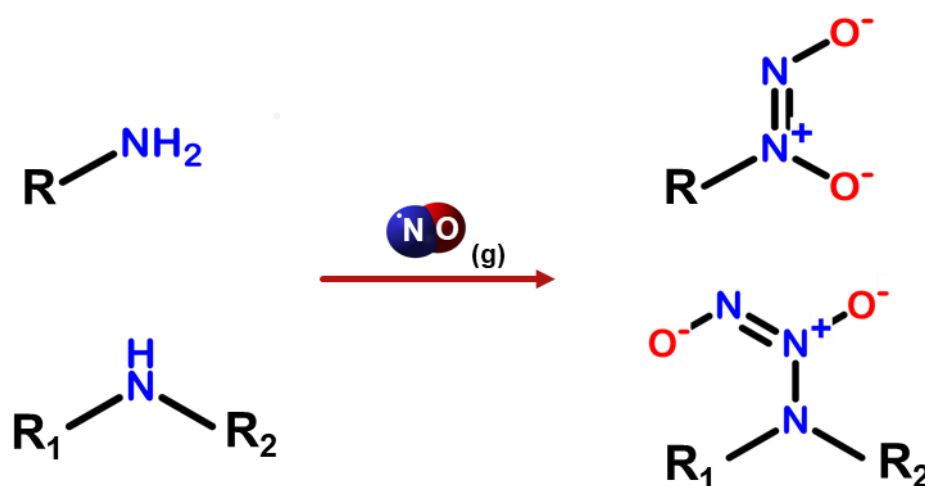


Figure 3. *N*-diazoniumdiolate synthesis from primary and secondary amine with gaseous NO.

NO is of great therapeutic interest, however, in its radical state it has a half-life far too short to be used in this form. Although, NO donors (RSNO and NONOates) have a much higher stability, they remain too labile for administration. These limitations have motivated the development of different strategies to obtain a localized NO delivery. The previously described synthesis methods of RSNO and NONOates (Equation 1 and **Figure 3**) have been adapted in many studies to obtain surfaces functionalized by NO donors. In this way, NO releasing surfaces are materials able to store NO and release it continuously under the influence of several triggers such as thermolysis, hydrolysis or S-NO bond cleavage by physiological reducers (**Figure 4 A, B, C**). NO generating materials are defined as surfaces able to catalyze the decomposition of endogenous compounds in NO. They are generally mimicking the activity of endogenous enzymes such as Glutathione peroxidase (Gpx). These two types of materials were created to restore or mimic a physiological release such as the one of the vascular endothelium or to confer to the surface a functionality as preventing biofilm formation. NO delivery is also of particular interest for wound healing purpose by combining antimicrobial and pro-angiogenic effects.^[20] This article is built as progress report focused on materials and surfaces able to release or to generate nitric oxide. Here, the methods to obtain colloidal objects having the same properties will not be discussed and can be found in other review articles.^[21–23] The development of functionalized surfaces imposes several constraints and limitations according to the adopted strategies. Firstly, the coating must be in adequacy with the original properties of the substrate (nature, shape, dimensions...). Secondly, a quantity of NO and a delivery kinetics compatible with the target biological effect must be achieved. Finally, the biocompatibility and the durability of the surface must also be considered. Over the past five years (2016-2021) many studies have been carried out on these topics and they will be discussed in the following sections.

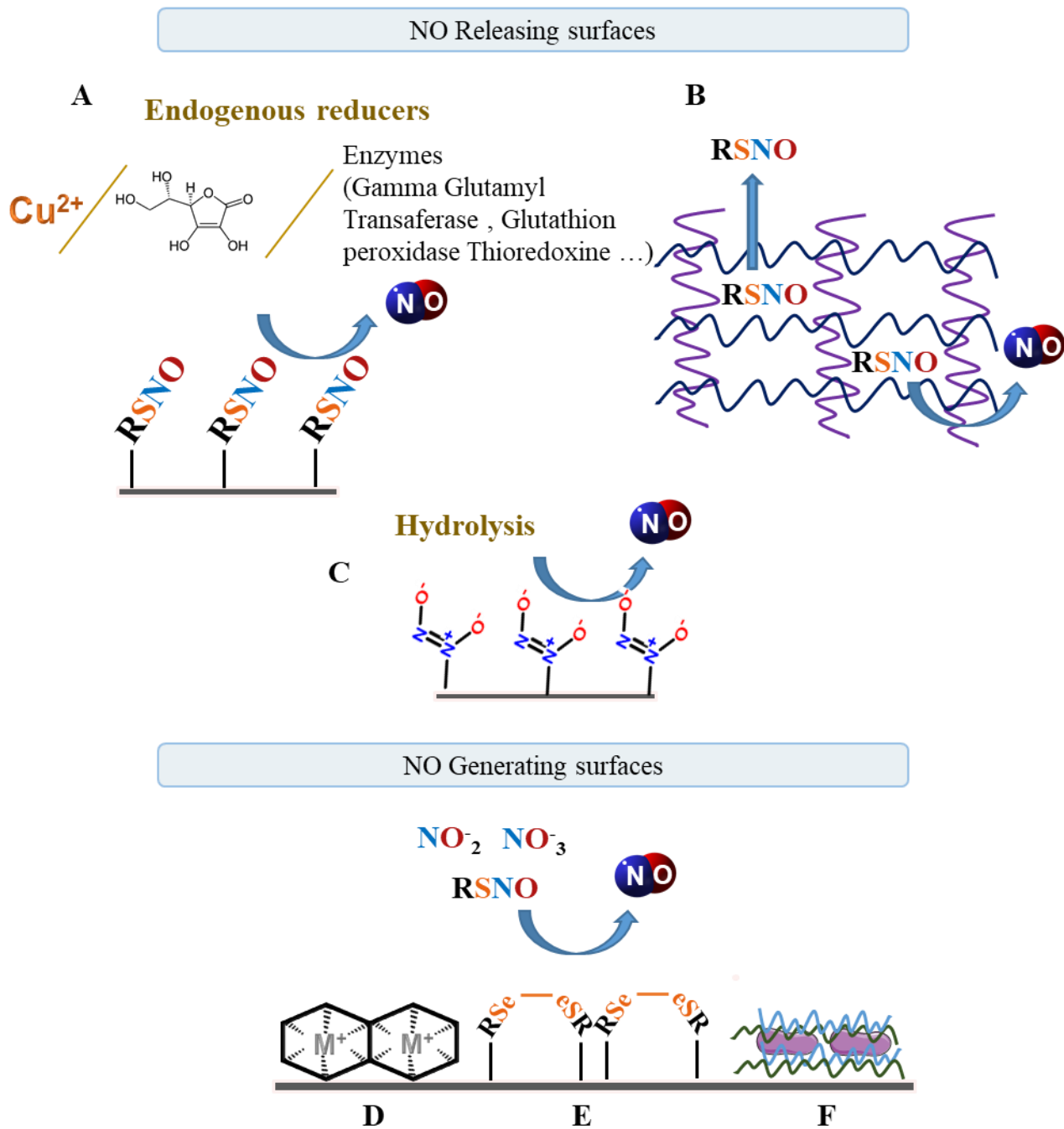


Figure 4. Overall scheme of the NO release by a functionalized surface. **(A)** NO release from a covalently bound RSNO. **(B)** NO release and/or RSNO leaching from a liquid impregnated material. **(C)** NO released from a N-diazeniumdiolate functionalized surface. Overall scheme of the NO generation by a surface catalyzing endogenous NO source degradation. NO generation from immobilized metallic reducer **(D)**, organoselenium species **(E)** and enzymes **(F)**.

2. NO Delivery

The study and the creation of NO delivering surfaces involve several challenges. Indeed, beyond the development of functionalization strategies, the quantity of available NO and its release kinetics are key points. As stated in the introduction, NO effect is mainly dependent on its concentration. The NO physiological production of the endothelium is about 0.05 to 0.4 nmol.cm⁻². min⁻¹.^[24] Thus, an application mimicking this type of function requires appropriate methods for the physicochemical characterization at these low levels. Surfaces providing an antibacterial effect are based on a design with higher NO load and releasing flux which also imposes design constraints.

2.1 Materials functionalized by NONOates

Table 1. NO releasing materials based on NONOate functionalization

NO source	Surface	NO release profile	Application	Results	Ref
<i>N</i> -Diazoniumdiolate functionalized silane	Titanium implant	Burst release of $78 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$	Antibacterial	0.8 log reduction of the number adhered bacteria (<i>P. aeruginosa</i>)	[25]
Graphene oxide multilayered film functionalized with <i>N</i> -Diazoniumdiolate	Si wafers and poly(ethylene terephthalate glycol)	Total NO load of $0.3\mu\text{M}\cdot\text{cm}^{-2}$ with releasing time of 3 days	Wound healing	Non-cytotoxic for human dermal fibroblasts. cell migration properties and wound closure promoted by NO release	[26]
Heparin nanoparticles functionalized by <i>N</i> -Diazoniumdiolate	Stainless steel coated with poly(glycidyl methacrylate) immobilizing particles	Maximum release of $385.2 \mu\text{M}$ for 10 days with a burst release of $167 \mu\text{M}$ during the first 12 h.	Synergistic effect of NO and heparin release allowed endothelialization and anticoagulant effects	Complete endothelialization of a stent after implantation in a rabbit atherosclerosis model	[27]
Poly(dopamine)coating functionalized by <i>N</i> -diazenuimdiolate	Glass substrate	burst release within the first few hours followed with a sustained flux for 48h	Antibiofilm	Bacteria killing study with functionalized coating showed 99, 96 and 70 % of reduction of bacterial attachment after 6, 24 and 36 h on the surface compared to unmodified glass.	[28]

Poly(ethylene)imine functionalized with <i>N</i> -diazoniumdiolate	Multilayered film of PEI and alginate	Maximal NO load of 0.3 $\mu\text{M} \cdot \text{cm}^{-2}$ with releasing time of 30 hours	No biological application tested	[29]	
Poly(- ϵ -lysine) functionalized with <i>N</i> -diazoniumdiolate	Contact lens gels obtained with Cross-linked hydrogel of poly(- ϵ -lysine) and nonanedioic acid	15 hours release with a total gel load of 30 $\mu\text{M} \cdot \text{mg}^{-1}$	Microbial keratitis treatment	Bacteria killing study showed a significant proliferation reduction of <i>S. aureus</i> and <i>P. aeruginosa</i> . Corneal epithelial cell metabolic activity maintained even with this high NO release	[30]

Surfaces functionalized by NONOates (Figure 4C and **Table 1**) are obtained by the reaction between an amine and gaseous NO under a high pressure to form a *N*-diazoniumdiolate function (with sodium methoxide as a catalyst). These amines can be initially present on the surface or brought *via* a synthesis strategy. *N*-diazoniumdiolate formed with a secondary amine can release two NO at physiological pH while the one obtained from a primary amine is decomposed in NO and HNO reducing the quantity of NO produced by this type of materials.^[31] The primary advantage of this functionalization strategy is that the release of NO does not respond to a specific trigger allowing a continuous release. The degradation of the *N*-diazoniumdiolate function into NO is highly responsive to acidity (H_3O^+) and hydrolysis. The flux of NO release can also be modulated by modifying the structure or the composition of the materials. Neighboring primary amines can increase the *N*-diazoniumdiolate stability^[19] (through H bond interaction) and can therefore slow down the release of NO. Polyelectrolyte multilayered (PEM) films are of a great interest in this context. They combine the benefits of the ease of creation on a wide variety of substrate and of using a polymer with a high amine content suitable for functionalization and stabilization. Jeong and co-workers developed PEM coatings applied through the layer-by-layer (LbL) method and composed of branched poly(ethyleneimine) and alginic acid.^[29] They optimized the conditions of film construction to promote the highest polymer deposition in order to obtain the highest NO loading. The diffusion of water and thus the hydrolysis rate (*i.e.* the NO releasing flux) can be reduced^[32] by adding a hydrophobic polymeric layer such as poly(urethane) to the film. Tanum and co-workers (**Figure 5**) reported multilayered films with a sustained release of NO provided amine stabilization combined to gas barrier properties of graphene oxide (GO).^[26] Graphene oxide was functionalized with tetraethylenepentamine (TEPA) or pentaethylenehexamine (PEHA). These molecules contain several secondary amines, for NONOates formation, and as well as two primary amines at their ends allowing an amide linkage with GO through a carbodiimide coupling and also conferring

a positive charge to GO. Multilayered films were built with oppositely charged GO sheets, the positive layer being the NONOate functionalized GO while the negative one corresponded to native GO. They demonstrated a significant increase of NO half-life and the total release duration depended on the number of layers highlighting the barrier effect carried by the graphene. NONOates functionalized surfaces all show the same NO release profile. They are characterized by a massive liberation within a few hours followed by a sustained release of a few days at most. It is therefore complicated to consider a long-term activity for this type of material. However, they could be well suited for antibacterial action in medical devices with low residence time (< 24h according to ISO 10993 classification). Based on this fact, Aveyard and co-worker created contact lens gels with a NO releasing hydrogel for the treatment of microbial keratitis.^[30] The duration of NO release (15 h) is in accordance with the time of need of this type of medical device.

In a general way, *N*-diazoniumdiolate functions are known to produce toxic by products such as nitrosamine. These molecules can induce a nitrosative stress and they are not under FDA approval, thus limiting their use at the moment in the field of biomaterials. One of the strategies used to overcome these potential toxicity issues is the functionalization of biomaterials with endogenous NO donor. Another limitation related to this type of surfaces is due to its water and thermal instability. In this way, in order to fully consider this type of structure for a medical device, it is important to select an appropriate method for sterilization (e.g. ethylene oxide) and storage (freeze dried). This may be a problem with the use of NONOates.



Figure 5. Graphene oxide functionalization by amine and NONOates. Amine stabilization of NONOate function (through H bond) and gas barrier effect carried by the layer by layer organization of graphene. (Reproduced from Tanum *et al.* 2019)

2.2 Materials functionalized by RSNO

Adding *S*-nitrosothiols on a surface as a reservoir of nitric oxide presents several advantages. *S*-nitrosothiols are considered as the NO donors with minimal toxicity and without oxidative/nitrosative stress induction. Half-lives (ranging from few minutes to several days) of RSNO are generally greater than NONOates. The addition of RSNO in a material is mainly achieved through two strategies. The first one consists in entrapping RSNO in a matrix to obtain a material able of NO delivery through RSNO degradation and/or leaching (Figure 4.B). The second is to covalently link RSNO molecules or to add a nitrosable function (thiols) to the material (Figure 4.A).

Table 2. NO releasing materials based on RSNO impregnation or RSNO covalent functionalization

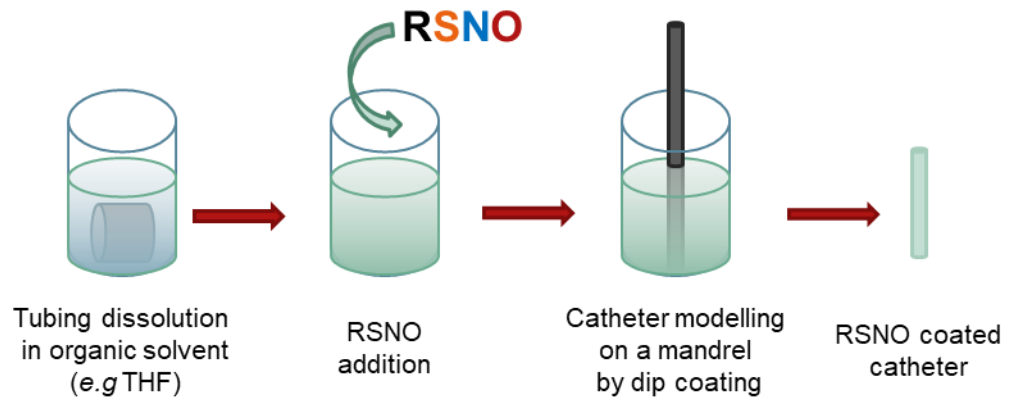
-	NO source	Surface	Flux	Application	Results	Ref
Liquid impregnation	GSNO	Poly(vinyl alcohol)/Poly(ethylene glycol) films containing RSNO and silver nanoparticles (AgNP)	15 nmol.cm ⁻² . min ⁻¹	Synergistic effect of GSNO and AgNP for Antibacterial and antitumor effect	<i>In vitro</i> assay revealed a significant reduction in cancerous cells viability	[33]
	SNAP	Impregnated silicone rubber tubing	0.2 nmol.cm ⁻² . min ⁻¹ during 2 weeks	Blood compatible surface	<i>In vivo</i> rabbit extracorporeal circuit thrombosis model showed an antithrombotic effect	[34]
	SNAP	Impregnated silicone rubber cannula	Initial burst release followed by a sustainable flux Over 0.05 nmol.cm ⁻² . min ⁻¹ during 2 weeks	Antibacterial effect for insulin pump cannula	Over 90 % of reduction of <i>S. aureus</i> and <i>S. epidermidis</i> adhesion and viability during 24 h	[35]
	SNAP	Impregnated silicone catheter	Initial burst release followed by a sustainable flux Over 0.05 nmol.cm ⁻² . min ⁻¹ during 2 months	Antibacterial effect for urinary catheter	Around 2 log reduction of <i>S. aureus</i> and <i>P. aeruginosa</i> viability after 7 days	[36]

SNAP	Impregnated poly(dimethylsiloxane) (PDMS)	0.1 nmol.cm ⁻² . min ⁻¹ during 24 h	Blood compatible surface	75 % reduction of platelets adhesion and 80 % of <i>S. aureus</i> adhesion reduction	[37]
SNAP	Spin coating of impregnated poly(urethanes) on silicone wafers	Burst release of 1.2 nmol.cm ⁻² . min ⁻¹ during 1 h followed by a flux of 0.2 nmol.cm ⁻² . min ⁻¹ during 24 h	Anti-bacterial surface	95 % of <i>S. aureus</i> viability reduction	[38]
Fluorinated SNAP	Impregnated poly(vinylidene fluoride) tubing	Increase of SNAP half-life by fluorination. NO release over 0.2 nmol.cm ⁻² . min ⁻¹ during 3 days and over 0.05 nmol.cm ⁻² . min ⁻¹ for up to 7 days	Anti-bacterial surface	Respectively 1 and 2 log reduction of <i>S. aureus</i> and <i>P. aeruginosa</i> viability	[39]
SNAP -fibrin microparticles	Cross linked Poly(ethylene glycol) hydrogel containing functionalized microparticles	0.015 nmol.cm ⁻² . min ⁻¹	Adherent hydrogel releasing NO for wound healing	No biological efficiency proof of concept	[40]

Covalently bound RSNO	Nitrosated thioglycolic acid (TGA)	Titania nanotubes arrays coated with multilayer film of chitosan-TGA-SNO and heparin	Release of 0.04 nmol . cm ⁻² during 20 minutes	Blood compatible surface	Platelet and leukocyte adhesion reduction	[41]
	RSNO modified mesoporous silica nanoparticles	Polyurethane membrane containing the functionalized particles	Burst release of 4.2 μmol . cm ⁻² during 20 minutes	No biological application		[42]
	SNAP covalently linked to poly(dimethylsiloxane) (PDMS)	(PDMS) substrate	4.3 μmol. cm ⁻² released in 25 days with a maximum flux of 0.4 nmol.cm ⁻² . min ⁻¹	Antibacterial effect and anti-platelet adhesion	99.99 % and 88 % reduction of <i>S. aureus</i> and platelets adhesion	[43]

2.2.1 Entrapped RSNO: Material impregnation with liquid RSNO

Impregnation can be achieved by swelling a polymeric tubing in an organic solvent to increase its permeability and allow the diffusion of molecules within the material. The alternative method consists in completely dissolving the tubing in an organic solvent and reforming a new material integrating RSNO (**Figure 6**). Regardless of the selected method, the solvent selection is the key point for liquid impregnation. It must induce an efficient polymer swelling without altering the tubing stability or on the contrary allow a total dissolution of polymeric tubing in order to model a new one. As reported in the **table 2**, *S*-nitroso-*N*-acetyl penicillamine is the most frequently RSNO used for this functionalization strategy. Indeed, this NO donor is a right choice because of its positive partition coefficient ($\text{Log } P = 0.96$) showing its lipophilicity and good solubility in organic solvent.^[44] For example, Wo et al 2017 determined that a mixture of methylethylketone and methanol (70%/30% MEK/MeOH) allowed an efficient swelling for incorporating SNAP on a poly(urethane) film without damaging the material.^[45] They studied the RSNO incorporation kinetic and found a maximum SNAP impregnation after 2 hours of soaking. The efficiency of these types of materials were already studied *in vivo*. Devine and coworkers tested the thrombus formation on a rabbit model.^[34] An extra corporeal circulation (ECC) model was used without and with SNAP impregnation. Continuous release of NO allowed by the addition of SNAP exhibited a significant anti-thrombogenic effect. This functionalization strategy also demonstrated an anti-bacterial activity when used for insulin cannula.^[46] Liquid impregnation is an effective strategy to obtain RSNO functionalized surfaces. However, it is limited to a few types of material (mainly polymeric tubing) and therefore for quite a few therapeutic applications. A wider range of NO releasing surface coatings can be created by covalently attached RSNO on the surface



- **Figure 6.** Schematic representation of the RSNO impregnated tube-making process

2.2.2 NO releasing surfaces functionalized by covalently bound *S*-nitrosothiols

Materials functionalized by covalently bound *S*-nitrosothiols might be considered as a promising source since these species represent the physiological storage form of NO. A few research groups have recently worked on the development of this type of surfaces. The functionalization relies on a two-step process. First, it needs the addition of a reduced thiol precursor to the surface that can be nitrosated. By following this strategy, Goudie and coworkers created a polydimethylsiloxane substrate grafted with SNAP. Their optimal construction reached a NO load of 4.3 $\mu\text{mol. cm}^{-2}$ released in 25 days and showed a significant anti-bacterial activity. Surfaces functionalized with covalently bonded RSNO present significant advantages. In contrast to materials designed by liquid impregnation a wide variety of substrate can be functionalized. Unlike materials bearing NONOate, RSNO functionalized surfaces mimic an endogenous source of NO and therefore do not present a toxicity risk. Lastly, in physiological conditions, only NO is released by this type of surfaces without the need of a specific triggers. However, covalently bound RSNO approach faces a major limitation in term of quantities of NO loaded. This phenomenon could be explained by the construction process of these materials. After addition of reduced thiols, they rapidly tend to the formation of disulfides thus reducing the number of functions available for nitrosation.

2.3 Nitric oxide formation catalyzed by the surface

The immobilization of NO on a surface regardless of the functionalization strategy employed represents a limited storage of available NO. An alternative strategy used to overcome this restriction is to generate NO from endogenous molecules. In this way, surfaces having a catalytically activity were created to potentially obtain an endless NO generating system (Table 3).

Table 3. NO generating materials through Gpx like activity based on metallic ions or organoselenium compounds.

	NO source	Surface	Flux	Application	Results	Ref
NO generation through Gpx like activity NO	Copper catechol amine network	Stainless steel (316 L SS) coated	From 7 to 75 nmol.cm ⁻² . min ⁻¹ depending on Cu ²⁺ loading	Cardiovascular (In stent restenosis and thrombosis)	<i>In vivo</i> stent implantation with re-endothelialization evaluation and thrombogenicity test	[47]
	Copper based on metal organic framework	Impregnation of Poly(vinyl alcohol) membranes	0.2 nmol.cm ⁻² . min ⁻¹	No biological application tested		[48]
	Copper complex and ascorbic acid reducing nitrite to Nitric oxide	Immobilized on Poly(vinyl chloride) coating	Burst release	Anti biofilm effect	Biofilm dispersal study through bacteria proteins quantification on the surfaces	[49]
	Copper based on metal organic framework	Layer by layer deposition on Hydroxylated titanium foil	From 3 to 13 nmol.cm ⁻² . min ⁻¹ depending on layers number	Cardiovascular (In stent restenosis and thrombosis)	Smooth muscle cells and macrophages inhibition, endothelial cells proliferation, Thrombogenicity determined <i>in vivo</i> with a rabbit arteriovenous shunt model	[50]
	Red ox coupling of copper and iron complexes	Immobilized on Poly (vinyl chloride) coating	Burst release	Antibiofilm effect	Biofilm dispersal study through bacteria proteins quantification on the surfaces	[51]
	Copper ions complexation by polydopamine	Polydopamine coating on Stainless Steel (316 L SS)	0.4 nmol.cm ⁻² . min ⁻¹	Cardiovascular (In stent restenosis)	Endothelial cells adhesion and proliferation enhancement and vascular remodeling after <i>in vivo</i> stent implantation	[52]

Copper ions complexation polydopamine	Polydopamine coating on Stainless Steel (316 L SS)	From 0 to 2.8 $\text{nmol.cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$ depending on Cu^{2+} loading	Cardiovascular (In stent restenosis and thrombosis)	Smooth muscles cells migration and proliferation inhibition, Endothelial cells migration and proliferation promotion. thrombus formation and vessel occlusion reduction on an <i>ex vivo</i> extracorporeal circulation system.	[53]
Co-immobilization of copper phenolic amine network and selenocystamine	Gallic acid forming a polyphenolic coating compatible with various substrates : stainless steel, glass, polyethylene terephthalate, TiO_2	From 0.9 to 1.4 $\text{nmol.cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$ depending on Cu^{2+} loading	Cardiovascular	Platelets adhesion, thrombus formation and vessel occlusion reduction on an <i>ex vivo</i> extracorporeal circulation system.re-endothelialization enhancement after in vivo stent implantation.	[54]
D- or L- selenocystine	Immobilization on TiO_2 films with polydopamine	Higher for L-selenocystine than D-selenocystine	Cardiovascular	NO generation and platelet adhesion and activation were dependent of the selenocystine chirality	[55]
Organoselenide compounds (2,2' diselenodiethanol)	Entrapped in a polyurethane film	Stable flux after 11 days ranging from 0.04 to 0.5 $\text{nmol.cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$ depending on selenium loading on the film	Cardiovascular	Hemocompatibility test: platelets adhesion, hemolysis, cytotoxicity.	[56]

Organoselenium covalently linked to polyethyleneimine	Vascular graft composed of polycaprolactone fibers coated with SePEI	Flux not reported	Cardiovascular	Endothelial cells adhesion and proliferation on the surface and anti-inflammatory phenotype transformation of macrophages after <i>in vivo</i> implantation of grafts.	[57]
Selenocystamine covalently linked to modified polyurethane	Polyurethane film modified by copolymerization with hydrophilic polymers	0.08 nmol.cm ⁻² .min ⁻¹	Cardiovascular	Inhibition of platelet adhesion and smooth muscle cells adhesion and proliferation. Promotion of endothelial cell proliferation	[58]

2.3.1 NO generation mediated by metal-

Metallic ions such as copper or zinc are known to catalyze the formation of NO from endogenous NO source such as RSNO (Figure 4D). Several strategies are available to incorporate metal ions into a material (**Table 3**). The mostly frequent one is the formation of coordination complexes between an organic compound and a metal. Song and coworkers developed a polydopamine coating complexing Cu²⁺ ions (Cu^{II}-DA complexes).^[53] They demonstrated that the final quantity of coordination complexes and NO generation flux were dependent on the initial Cu²⁺ feeding concentration used during the film construction, suggesting that the catalytic ability could be controlled. Catalytic activity of the Cu^{II}-DA coating was found stable over 15 days by maintaining a flux representing 40% of the initial NO generation. Finally, this strategy was found effective for a cardiovascular application. Coated 316L stainless steel revealed a significant ability to enhance endothelial cell growth and to reduce smooth muscle cells proliferation demonstrating the suitability of this coatings to prevent in stent restenosis. NO generation mediated by metallic ions immobilization was also effective for biofilm inhibition purpose. Wonoputri and co-workers developed a coating containing coordination complexes of copper and iron.^[51] The co-immobilization of this mixture of metallic ions created a redox cycle reducing the copper (II) on copper (I). The copper (I) formation here, was of a particular interest because of its ability to reduce nitrite ions produced by bacteria on to NO. Another approach using the Gpx like activity of immobilized metallic ions is based on the formation of metal organic frameworks (MOF) on a surface.^[59] This mesh arrangement allows the formation of wider structure with a 2 or 3-dimensional organization. Copper based MOF were created on titanium substrate by Zhao and coworkers in order to improve cardiovascular stents efficiency.^[50] They employed carboxylated benzenic compounds bridging Cu²⁺ ions, this organization allowed the formation a layer by layer coating. The flux generated by the surface was found proportional to the number of layers. The optimal construction in term of biological efficiency was formed with 10 layers. Beyond the *in vitro*

effects on endothelial cells proliferation, on smooth muscle cells growth inhibition, on platelets and on macrophages adhesion and activation, coated titanium wires effectively inhibited neointimal hyperplasia after *in vitro* implantation in rat abdominal aorta.

2.3.2 NO generation mediated by selenium derivate

Organoselenium species (RSe) are one of the catalysts that can generate NO. They are known to carry a Gpx-like activity.^[60] The diselenide form can catalyze the denitrosation of RSNO to produce NO and thiols through redox reaction leading to the organoselenium reduced form (Figure 4E).

Recent advances focused on the enhancement of the catalytic stability of the selenium based NO generating surfaces (Table 3). Qu and coworkers created a polyurethane (PU) film containing a covalently linked selenocystamine inducing a physiological level of NO.^[61] They observed a continuous decomposition of RSNO for at least 30 days in a PBS/GSH solution. The kinetics of NO generation by this type of material is generally composed of two phases. The first one corresponds to a strong flux of generated NO, followed by a strong decrease. This step of reorganization of the material determines the durability of the catalytic surface. The second phase is characterized by the appearance of a stable flux. In this way, Qu and coworkers reported that during the reorganization, low molecular Se-PU segments could leak from the surface while high molecular Se-PU segments are kept trapped in the PU film. Fan and coll. also studied the influence of the surface structuration on NO generation.^[55] They demonstrated that the selection of the chirality of (D- or L-) selenocystine can significantly influence the NO generation and therefore the surface biocompatibility (*e.g* platelet adhesion). Thus, the design of the surface in terms of structuration and composition is a key point to manage in order to keep a long-term catalytic activity. Advances are also oriented towards the construction of multifunctional platforms designed to reinforce the action of NO. Jin and coworkers created a polyvalent surface mimicking the vascular endothelium by the co-immobilization of complexes made of cyclodextrin (CD) functionalized through host-guest interaction with lysine (CD-L) and sulfonate (CD-S) on a modified polyurethane film containing selenocystamine.^[58] The polyurethane substrate was modified by the

copolymerization with a hydrophilic monomer (2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)) conferring a resistance to cell adhesion on the surface.^[62] CD-L was used to add a fibrinolytic activity to the surface by absorbing plasminogen and so on, enhance the anticoagulant effect of NO. CD-S acted synergistically with NO to promote endothelial cell proliferation by providing a heparin-like^[63] function to the film. Tang and coworkers created a vascular graft composed of poly(caprolactone) fibers combining a bioinert and a bioactive strategy to enhance its blood compatibility.^[57] They coated the graft with a multilayered film based on an organoselenium functionalized polyethylene imine (SePEI) and hyaluronate. They added an adhesion peptide coming from a sequence in laminin (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) peptide) grafted to PEG chain as the last layer of their vascular graft. *In vivo*, this organization showed an enhanced endothelialization after implantation in the abdominal aorta of rats. Interestingly, the authors also reported the infiltration of macrophages on the graft. Immunostaining of the infiltrating cells revealed the presence of M2 macrophages expressing the anti-inflammatory specific marker CD 206, highlighting an increase of the anti-inflammatory phenotype induced by the *in situ* NO generation.

2.3.3 NO generation mediated by enzyme

Table 4. NO generating materials based on enzymatic activity.

	Surface organization	Enzyme	substrate	NO Flux	Application	Results	Ref
	Silanized 316 stainless steel	Inducible NO Synthase (iNOS) covalently linked to silane	L-arginine and NADPH as cofactor	NO flux was assimilated to the enzyme activity. It was found stable and over $0.1 \text{ nmol.cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ during 6 months	cardiovascular	Enhanced Endothelial cells adhesion and platelet resistance compared to bare surface	[64]
NO generation Mediated by enzyme	Round metallic wires (alloy 35N LT, 316L and L605) coated	Beta-galactosidase immobilized on a PSS-PAH multilayered film	Beta-gal-NONOate used as NO prodrug	NO flux was found dependent of the concentration of enzyme substrate (Beta-gal-NONOate). A linear flux of $0.1 \text{ nmol.cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ was measured in presence of $20 \mu\text{M}$ of Beta-gal-NONOate	cardiovascular	<i>Ex vivo</i> measurement of relaxation degree of rat mesenteric arteries showed a significant effect carried by the catalytic multilayered polyelectrolyte coating	[65]
		Inducible NO Synthase Oxygenase (iNOS) immobilized via electrostatic adsorption on Poly ethylene imine film	L-arginine and NADPH as cofactor	linear flux of $0.3 \text{ nmol.cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$	Desing of an antithrombogenic coating for blood contacting medical devices	No biological evidence of the effectiveness of the biological effectiveness of NO generation by this strategy	[66]

The generation of NO by a surface can be achieved by the immobilization of an enzyme having for substrate a compound that can produce NO (Figure 4F and **Table 4**). Nitric oxide is physiologically formed by a family of enzymes called NO Synthase (NOS) by catalyzing the oxidation of L-arginine to L-citrulline with NADPH as cofactor.^[67] Three types of NOS are found, neuronal and endothelial types (nNOS / eNOS) are constitutively expressed and they produce nanomolar amount of NO during short periods.^[68,69] The third form of NOS is the inducible NO Synthase (iNOS) produced only in response to specific triggers such as pro-inflammatory signals. This enzyme is able to produce a greater amount of NO over a longer period of time than the other two. The iNOS was therefore considered as the most attractive to create a NO generating surface through enzyme immobilization. Alagem-Shafir and co-workers developed a coating immobilizing iNOS on stainless steel for a stent optimization purpose.^[64] Stainless steel surfaces were oxidized by phosphoric acid and then silanized, INOS was covalently linked to silanes using glutaraldehyde. Enzyme activity was maintained after linking to the surface, NO generation was indirectly determined by the quantification of the L-citrulline co-produced by the enzyme reaction after addition of L-arginine. This strategy produced a stable NO flux of $0.1 \text{ nmol.cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ during 6 months and was found efficient to avoid platelet adsorption compared to a bare stainless-steel surface. Gunasekera and coworkers reached a higher NO flux of $0.3 \text{ nmol.cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ by optimizing the quantity of iNOS immobilized.^[66] It is interesting to notice that this value is close to the physiological level of NO production by human endothelial cells ($0.4 \text{ nmol.cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$).^[70] They studied a layer-by-layer (LbL) organization allowing the immobilization of iNOS through electrostatic interactions with a cationic polyelectrolyte (poly(ethyleneimine)). By modifying the pH of the medium during the film construction and therefore the net charge of the protein, they observed a higher protein immobilization on the PEM film. Even if the use of iNOS as a NO catalyzer seems interesting, the long-term effectiveness of this type of coating is debatable. Indeed, iNOS is known to follow

a self-inhibition mechanism regulated by its own NO production. In order to avoid this type of limitation due to the enzymatic regulation phenomena, Winther and coworkers developed an enzyme-prodrug strategy without using an enzyme regulated by NO.^[71] They created a catalytic surface by immobilizing β -galactosidase on layer by layer films composed of poly(allylamine) (PAH) and poly(styrene sulfonate) (PSS). NO production was initiated by the addition of a functionalized substrate, the β -gal-NONOates, which can be hydrolyzed by the surface. NO flux was found dependent of the concentration of enzyme substrate (β -gal-NONOate) and a linear flux of $0.1 \text{ nmol.cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ was measured in presence of $20 \mu\text{M}$ of β -gal-NONOate.

2.4 Hybrid materials: NO release and generation

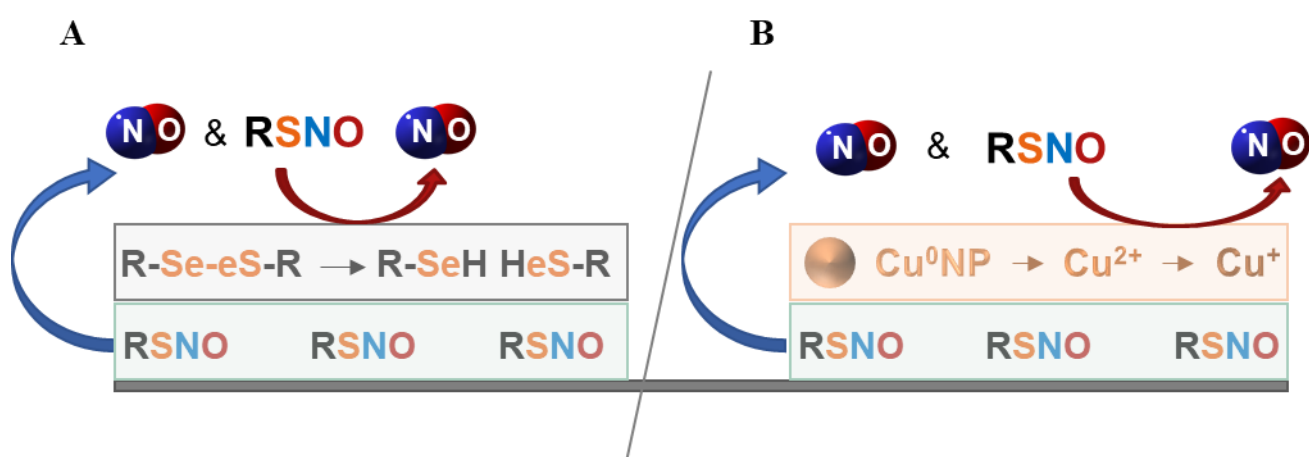


Figure 7. Hybrid materials providing NO release or NO generation from leached and endogenous RSNO catalyzed by coatings based on an organoselenium (A) or containing metallic species (B).

Table 5. NO release mediated by hybrid materials

Surface organization	NO storage	NO releasing strategy	NO Flux	Application	Results	Ref
Medical grade polymer incorporating RSNO and reducer	SNAP	Copper nanoparticles	From 0.1 to 0.4 nmol.cm ⁻² .min ⁻¹ depending on CuNP loading	Antibacterial and anti-platelet adhesion	Up to 5 log reduction of the amount of forming bacterial (gram negative and positive) unit on the SNAP/CuNP dopped polymer	[72]
Medical grade polymer incorporating RSNO and reducer	SNAP	Zinc oxide nanoparticles		Antibacterial		[73]
SNAP/ organoselenium on a Polyuréthane coating	Liquid impregnation with SNAP	organoselenium coating		Anti-thrombus and bacterial		[74]

Hybrid materials are materials combining the both strategies of NO release and NO generation previously described (**Table 5**). These materials represent surfaces containing a NO donor and a catalyzer (**Figure 7**). The selection of the quantity of the two compounds allows the modulation of the NO release from the surface. In addition, once the NO stock has been completely consumed, the catalyzer in the material can still act as a NO generating surface. A physiological flux allowing a cardio-vascular application was reached thank to this strategy [REF 72].

3. Smart materials: inducible release

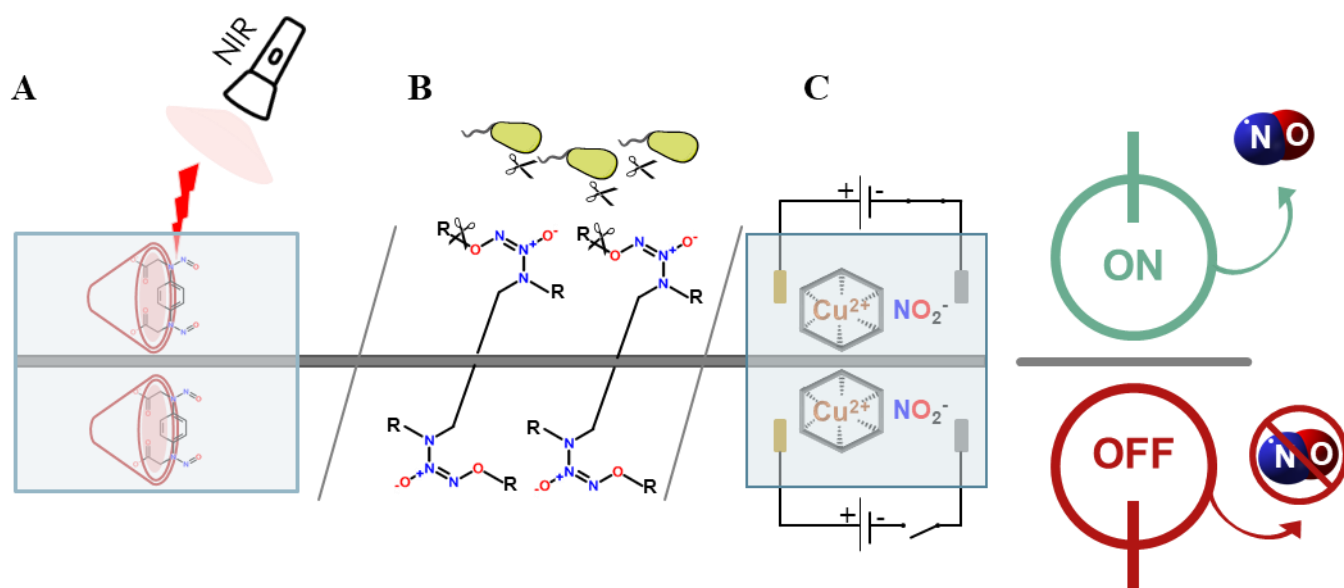


Figure 8. Smart material releasing NO under a specific trigger, (A) Hydrogel containing β -CD functionalized with a photolabile *N*-dinitroso donor triggered by Near Infra-Red (NIR). (B) Polymer composite embedding protected NONOate responding to bacterial nitro reductase. (C) NO emitting electrochemical device enabling the reduction of nitrite by Cu(II) complexes.

Table 6. Surfaces with an inducible NO release.

Surface organization	NO storage	NO releasing strategy	NO Flux	Application	Results	Ref
Crosslinked hydrogel of Hyaluronic acid and poly(dopamine)	β -CD functionalized with a photolabile <i>N</i> -dinitroso donor embedded in the hydrogel	NIR photolysis of the <i>N</i> -dinitroso function		Bacteria-infected wound healing	<i>In vivo</i> efficiency of the hydrogels for wound healing revealed a higher inflammatory response followed by an enhancement of reepithelialization and angiogenesis	[75]
Poly(vinyl chloride) / Poly(urethane) film containing NONOate	NONOate function protected by a nitroaromatic group	NONOate function deprotection by bacterial enzymes	2.7 nmol. cm ⁻² .min ⁻¹ with a total release of 4 μ mol	Antibacterial effect against bacteria expressing nitroreductase enzymes	Bacteria killing assay revealed 60 % cell viability with <i>E. coli</i>	[76]

Silicone rubber patch	Copper (II) coordination complexes and nitrites	Electrochemical NO release induced by nitrite reduction by copper	Between 0.08 – 0.10 nmol. cm ⁻² .min ⁻¹	Antibacterial	Over 99% reduction of cell viability with <i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i> [77]
-----------------------	---	---	---	---------------	--

The optimal material should be able to deliver NO only when pathophysiological conditions require it. Based on this principle, several teams created inducible systems responding to specific triggers (**Figure 8 and Table 6**). Lee and coworkers developed patch emitting NO by an electrochemical modulation.^[77] An inducible system was created by incorporating heterogenic coordination complexes formed with copper and nitrite ions interacting with tri(2-pyridylmethyl)amine. The nitrite reduction to NO is managed by the application of a low voltage. This strategy was found effective to inhibit the bacterial proliferation promoting the wound healing. Hibbard and coworkers developed a diazenomiumdiolate function protection to avoid unspecific release of NO.^[78] This NONOate prodrug was entrapped in a PU/PVC medical grade polymeric film. The deprotection reaction is induced by a bacterial nitroreductase enzyme frequently expressed by pathogenic bacteria such as *E. coli*. The release of NO is initiated only in the presence of nitrate reductase producing bacteria and the flow of NO is proportional to the quantity of bacteria. This organization also proved the limitation of the NONOate strategy. To avoid unspecific release caused by the function hydrolysis, the prodrug was immobilized on a hydrophobic film. However, this type of coating also has the disadvantage of limiting the diffusion of bacterial enzymes within it. This fact was confirmed by the experiments conducted by this team. The increase in the amount of NONOate in the film was not correlated with an increase in the NO released. The hypothesis suggested by the authors relies on the fact that the bacterial enzymes only degrade the active ingredients that are available on top of the film.

4. Conclusions and outlooks

Table 7. Summary of characteristics, advantages, limitations and applications of NO releasing and generating strategies.

Strategies	NO source	-	+	Recommended (optimal) application
NO releasing	NONOates	-Burst release -Potential toxicity (nitrosamine) -Stability	high quantities immobilized	Short time antibacterial effects
	RSNO impregnation	-Very limited compatible materials	Ease of creation	Reduction of the risks of infection and thrombosis for blood contacting polymeric cannulas
	Covalently bound RSNO	- Rarely high quantities immobilized -Stability	-Wide variety of functionalizable surfaces -Limited risk of toxicity	Still needs improvement
NO generating	Organoselenium	-Ineffective in cases of physiological RSNO deficiency	-Limited risk of toxicity -Almost endless NO generation	Suitable for mimicking a physiological release activity such as vascular endothelium

Metallic reducers		<ul style="list-style-type: none"> -Potential toxicity (metallic ions leaching) - Ineffective in cases of physiological RSNO deficiency 	<ul style="list-style-type: none"> -Almost endless NO generation 	Suitable for mimicking a physiological release activity such as vascular endothelium
Enzyme		<ul style="list-style-type: none"> -Possible enzyme inhibition or degradation - NO flux depending on the enzyme substrate quantity 	NO flux depending on the enzyme substrate quantity	Application is determined by the surface design
Hybrid materials	NO Store + Reducer	<ul style="list-style-type: none"> -Has the drawbacks of the selected strategies to store NO and to generate it 	<ul style="list-style-type: none"> -Tunable flux according to the proportions between NO stored and reducer - Can still act as a NO generating material once the NO store is consumed 	Antibacterial effect if designed for a burst release of the NO stored
Smart materials	Several possible approaches	Complex design	<ul style="list-style-type: none"> -Inducible release -Flux proportional to the pathophysiological need 	Application is determined by the surface design

In this article, we described the different strategies to obtain surfaces presenting localized release and/or generation of NO, they all have same advantages and limitations which conditions their application (**Table 7**). The materials based on NONOates functionalization are very sensitive to hydrolysis. This leads to a burst release under physiological condition or it imposes the design of very hydrophobic coatings. They also present a risk of production of toxic by-products (nitrosamine). Therefore, it is preferable to reserve their use to create materials with a short time antibacterial effects and with a short time of contact, such as wound dressing. RSNO liquid impregnation is a strategy allowing the creation of high NO loaded materials with a sustainable release. However, it is only compatible with plastic polymer matrices. Thus, they are highly effective in preventing biofilm and thrombus formation on the inner face of cannulas dedicated to extracorporeal blood circulation. The functionalization of materials with covalently bonded RSNO is probably the most challenging strategy. High NO load is problematic to achieve, probably because the thiols and RSNO functions are highly redox-sensitive. But, this strategy remains interesting to develop because it is mimicking the physiological form of NO storage and thus does not present a toxicity risk. The effectiveness of NO generating surfaces could be limited in case of deficiency in endogenous NO sources frequently occurring in pathophysiological situation. In addition, materials releasing metal ions may present toxicity issues and enzyme-based surfaces could encounter enzymatic inhibition phenomena. Hybrid materials result from the addition of a NO release and NO generation strategy. They have the limitations and constraints of the strategies they combine. Thus, the surfaces immobilizing RSNO by liquid impregnation for the NO load part are limited to a restricted number of matrices and the materials using metal ions for the catalytic part may also encounter toxicity issues related to the ions leaching. Smart material with an inducible NO release represents the most promising strategy. However, the complexity of their design is a limitation imposing extensive development. To conclude, to date, there is no ideal NO-

delivering surface. However, we hope that this article will help readers to select the design of the NO delivering surface according to its expected requirement (NO load, flux, release time, location...).

References

- (1) Zelikin, A. N. Drug Releasing Polymer Thin Films: New Era of Surface-Mediated Drug Delivery. *ACS Nano* **2010**, *4* (5), 2494–2509. <https://doi.org/10.1021/nn100634r>.
- (2) Bredt, D. S. Nitric Oxide: A Physiologic Messenger Molecule. 21.
- (3) Lancaster, J. R. A Tutorial on the Diffusibility and Reactivity of Free Nitric Oxide. *Nitric Oxide* **1997**, *1* (1), 18–30. <https://doi.org/10.1006/niox.1996.0112>.
- (4) Lancaster, J. R. Nitroxidative, Nitrosative, and Nitrative Stress: Kinetic Predictions of Reactive Nitrogen Species Chemistry Under Biological Conditions. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19* (9), 1160–1174. <https://doi.org/10.1021/tx060061w>.
- (5) Ford, P. C.; Miranda, K. M. The Solution Chemistry of Nitric Oxide and Other Reactive Nitrogen Species. *Nitric Oxide* **2020**, *103*, 31–46. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.07.004>.
- (6) Jones, M. L.; Ganopolsky, J. G.; Labbé, A.; Wahl, C.; Prakash, S. Antimicrobial Properties of Nitric Oxide and Its Application in Antimicrobial Formulations and Medical Devices. *Appl Microbiol Biotechnol* **2010**, *88* (2), 401–407. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2733-x>.
- (7) Juedes, M. J.; Wogan, G. N. Peroxynitrite-Induced Mutation Spectra of PSP189 Following Replication in Bacteria and in Human Cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **1996**, *349* (1), 51–61. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(95\)00152-2](https://doi.org/10.1016/0027-5107(95)00152-2).
- (8) Groote, M. A. D.; Fang, F. C. NO Inhibitions: Antimicrobial Properties of Nitric Oxide. *Clinical Infectious Diseases* **1995**, *21*, S162–S165.
- (9) Loscalzo, J.; Welch, G. Nitric Oxide and Its Role in the Cardiovascular System. *Progress in Cardiovascular Diseases* **1995**, *38* (2), 87–104. [https://doi.org/10.1016/S0033-0620\(05\)80001-5](https://doi.org/10.1016/S0033-0620(05)80001-5).
- (10) Mendelsohn, M. E.; O'Neill, S.; George, D.; Loscalzo, J. Inhibition of Fibrinogen Binding to Human Platelets by S-Nitroso-N-Acetylcysteine. *Journal of Biological Chemistry* **1990**, *265* (31), 19028–19034. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)30619-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)30619-1).
- (11) Kubes, P.; Suzuki, M.; Granger, D. N. Nitric Oxide: An Endogenous Modulator of Leukocyte Adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1991**, *88* (11), 4651–4655. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.11.4651>.
- (12) Marks, D. S.; Vita, J. A.; Folts, J. D.; Keaney, J. F.; Welch, G. N.; Loscalzo, J. Inhibition of Neointimal Proliferation in Rabbits after Vascular Injury by a Single Treatment with a Protein Adduct of Nitric Oxide. *J. Clin. Invest.* **1995**, *96* (6), 2630–2638. <https://doi.org/10.1172/JCI118328>.
- (13) Garg, U. C.; Hassid, A. Nitric Oxide-Generating Vasodilators and 8-Bromo-Cyclic Guanosine Monophosphate Inhibit Mitogenesis and Proliferation of Cultured Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Clin. Invest.* **1989**, *83* (5), 1774–1777. <https://doi.org/10.1172/JCI114081>.
- (14) Fukuo, K.; Inoue, T.; Morimoto, S.; Nakahashi, T.; Yasuda, O.; Kitano, S.; Sasada, R.; Ogihara, T. Nitric Oxide Mediates Cytotoxicity and Basic Fibroblast Growth Factor Release in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells. A Possible Mechanism of Neovascularization in

- Atherosclerotic Plaques. *J. Clin. Invest.* **1995**, *95* (2), 669–676.
<https://doi.org/10.1172/JCI117712>.
- (15) Broniowska, K. A.; Hogg, N. The Chemical Biology of S-Nitrosothiols. *Antioxidants & Redox Signaling* **2012**, *17* (7), 969–980. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4590>.
- (16) Friebe, A.; Koesling, D. Regulation of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase. *Circulation Research* **2003**, *93* (2), 96–105.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000082524.34487.31>.
- (17) Ravi, K.; Brennan, L. A.; Levic, S.; Ross, P. A.; Black, S. M. S-Nitrosylation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Is Associated with Monomerization and Decreased Enzyme Activity. *6*.
- (18) Rassaf, T.; Feelisch, M.; Kelm, M. Circulating No Pool: Assessment of Nitrite and Nitroso Species in Blood and Tissues. *Free Radical Biology and Medicine* **2004**, *36* (4), 413–422. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.011>.
- (19) Keefer, L. K. Fifty Years of Diazeniumdiolate Research. From Laboratory Curiosity to Broad-Spectrum Biomedical Advances. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6* (11), 1147–1155.
<https://doi.org/10.1021/cb200274r>.
- (20) Jen, M. C.; Serrano, M. C.; van Lith, R.; Ameer, G. A. Polymer-Based Nitric Oxide Therapies: Recent Insights for Biomedical Applications. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22* (2), 239–260. <https://doi.org/10.1002/adfm.201101707>.
- (21) Yang, Y.; Qi, P. K.; Yang, Z. L.; Huang, N. Nitric Oxide Based Strategies for Applications of Biomedical Devices. *Biosurface and Biotribology* **2015**, *1* (3), 177–201.
<https://doi.org/10.1016/j.bsbt.2015.08.003>.
- (22) Carpenter, A. W.; Schoenfisch, M. H. Nitric Oxide Release: Part II. Therapeutic Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (10), 3742. <https://doi.org/10.1039/c2cs15273h>.
- (23) Naghavi, N.; de Mel, A.; Alavijeh, O. S.; Cousins, B. G.; Seifalian, A. M. Nitric Oxide Donors for Cardiovascular Implant Applications. *Small* **2013**, *9* (1), 22–35.
<https://doi.org/10.1002/sml.201200458>.
- (24) de Mel, A.; Murad, F.; Seifalian, A. M. Nitric Oxide: A Guardian for Vascular Grafts? *Chem. Rev.* **2011**, *111* (9), 5742–5767. <https://doi.org/10.1021/cr200008n>.
- (25) Li, M.; Aveyard, J.; Fleming, G.; Curran, J. M.; McBride, F.; Raval, R.; D'Sa, R. A. Nitric Oxide Releasing Titanium Surfaces for Antimicrobial Bone-Integrating Orthopedic Implants. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12* (20), 22433–22443.
<https://doi.org/10.1021/acsami.0c00871>.
- (26) Tanum, J.; Jeong, H.; Heo, J.; Choi, M.; Park, K.; Hong, J. Assembly of Graphene Oxide Multilayer Film for Stable and Sustained Release of Nitric Oxide Gas. *Applied Surface Science* **2019**, *486*, 452–459. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.04.260>.
- (27) Zhu, T.; Zhou, M.; Gao, W.; Fang, D.; Liu, Z.; Wu, G.; Wan, M.; Mao, C.; Shen, J. Coronary Stents Decorated by Heparin/NONOate Nanoparticles for Anticoagulant and Endothelialized Effects. *Langmuir* **2020**, *36* (11), 2901–2910.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00112>.
- (28) Sadrearhami, Z.; Shafiee, F. N.; Ho, K. K. K.; Kumar, N.; Krasowska, M.; Blencowe, A.; Wong, E. H. H.; Boyer, C. Antibiofilm Nitric Oxide-Releasing Polydopamine Coatings. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (7), 7320–7329.
<https://doi.org/10.1021/acsami.8b16853>.

- (29) Jeong, H.; Park, K.; Yoo, J.-C.; Hong, J. Structural Heterogeneity in Polymeric Nitric Oxide Donor Nanoblended Coatings for Controlled Release Behaviors. *RSC Adv.* **2018**, *8* (68), 38792–38800. <https://doi.org/10.1039/C8RA07707J>.
- (30) Aveyard, J.; Deller, R. C.; Lace, R.; Williams, R. L.; Kaye, S. B.; Kolegraff, K. N.; Curran, J. M.; D'Sa, R. A. Antimicrobial Nitric Oxide Releasing Contact Lens Gels for the Treatment of Microbial Keratitis. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (41), 37491–37501. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b13958>.
- (31) Salmon, D. J.; Torres de Holding, C. L.; Thomas, L.; Peterson, K. V.; Goodman, G. P.; Saavedra, J. E.; Srinivasan, A.; Davies, K. M.; Keefer, L. K.; Miranda, K. M. HNO and NO Release from a Primary Amine-Based Diazeniumdiolate As a Function of PH. *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (8), 3262–3270. <https://doi.org/10.1021/ic101736e>.
- (32) Soto, R. J.; Merricks, E. P.; Bellinger, D. A.; Nichols, T. C.; Schoenfisch, M. H. Influence of Diabetes on the Foreign Body Response to Nitric Oxide-Releasing Implants. *Biomaterials* **2018**, *157*, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.11.044>.
- (33) Rolim, W. R.; Pieretti, J. C.; Renó, D. L. S.; Lima, B. A.; Nascimento, M. H. M.; Ambrosio, F. N.; Lombello, C. B.; Brocchi, M.; de Souza, A. C. S.; Seabra, A. B. Antimicrobial Activity and Cytotoxicity to Tumor Cells of Nitric Oxide Donor and Silver Nanoparticles Containing PVA/PEG Films for Topical Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (6), 6589–6604. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b19021>.
- (34) Devine, R.; Goudie, M. J.; Singha, P.; Schmiedt, C.; Douglass, M.; Brisbois, E. J.; Handa, H. Mimicking the Endothelium: Dual Action Heparinized Nitric Oxide Releasing Surface. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12* (18), 20158–20171. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b22277>.
- (35) Chug, M. K.; Feit, C.; Brisbois, E. J. Increasing the Lifetime of Insulin Cannula with Antifouling and Nitric Oxide Releasing Properties. *ACS Appl. Bio Mater.* **2019**, *2* (12), 5965–5975. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00908>.
- (36) Homeyer, K. H.; Goudie, M. J.; Singha, P.; Handa, H. Liquid-Infused Nitric-Oxide-Releasing Silicone Foley Urinary Catheters for Prevention of Catheter-Associated Urinary Tract Infections. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2019**, *5* (4), 2021–2029. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01320>.
- (37) Devine, R.; Singha, P.; Handa, H. Versatile Biomimetic Medical Device Surface: Hydrophobin Coated, Nitric Oxide-Releasing Polymer for Antimicrobial and Hemocompatible Applications. *Biomater. Sci.* **2019**, *7* (8), 3438–3449. <https://doi.org/10.1039/C9BM00469F>.
- (38) Singha, P.; Pant, J.; Goudie, M. J.; Workman, C. D.; Handa, H. Enhanced Antibacterial Efficacy of Nitric Oxide Releasing Thermoplastic Polyurethanes with Antifouling Hydrophilic Topcoats. *Biomater. Sci.* **2017**, *5* (7), 1246–1255. <https://doi.org/10.1039/C6BM00948D>.
- (39) Zhou, Y.; Zhang, Q.; Wu, J.; Xi, C.; Meyerhoff, M. E. Synthesis and Characterization of a Fluorinated S -Nitrosothiol as the Nitric Oxide Donor for Fluoropolymer-Based Biomedical Device Applications. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6* (38), 6142–6152. <https://doi.org/10.1039/C8TB01814F>.
- (40) Joseph, C. A.; McCarthy, C. W.; Tyo, A. G.; Hubbard, K. R.; Fisher, H. C.; Altscheffel, J. A.; He, W.; Pinnaratip, R.; Liu, Y.; Lee, B. P.; Rajachar, R. M. Development of

- an Injectable Nitric Oxide Releasing Poly(Ethylene) Glycol-Fibrin Adhesive Hydrogel. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2019**, *5* (2), 959–969. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01331>.
- (41) Simon-Walker, R.; Romero, R.; Staver, J. M.; Zang, Y.; Reynolds, M. M.; Popat, K. C.; Kipper, M. J. Glycocalyx-Inspired Nitric Oxide-Releasing Surfaces Reduce Platelet Adhesion and Activation on Titanium. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2017**, *3* (1), 68–77. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00572>.
- (42) Malone-Povolny, M. J.; Schoenfisch, M. H. Extended Nitric Oxide-Releasing Polyurethanes via *S*-Nitrosothiol-Modified Mesoporous Silica Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (13), 12216–12223. <https://doi.org/10.1021/acscami.8b19236>.
- (43) Goudie, M. J.; Singha, P.; Hopkins, S. P.; Brisbois, E. J.; Handa, H. Active Release of an Antimicrobial and Antiplatelet Agent from a Nonfouling Surface Modification. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (4), 4523–4530. <https://doi.org/10.1021/acscami.8b16819>.
- (44) Gaucher, C.; Boudier, A.; Dahboul, F.; Parent, M.; Leroy, P. *S*-Nitrosation/Denitrosation in Cardiovascular Pathologies: Facts and Concepts for the Rational Design of *S*-Nitrosothiols. *CPD* **2012**, *19* (3), 458–472. <https://doi.org/10.2174/1381612811306030458>.
- (45) Wo, Y.; Li, Z.; Brisbois, E. J.; Colletta, A.; Wu, J.; Major, T. C.; Xi, C.; Bartlett, R. H.; Matzger, A. J.; Meyerhoff, M. E. Origin of Long-Term Storage Stability and Nitric Oxide Release Behavior of CarboSil Polymer Doped with *S*-Nitroso-*N*-Acetyl-*D*-Penicillamine. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (40), 22218–22227. <https://doi.org/10.1021/acscami.5b07501>.
- (46) Chug, M. K.; Feit, C.; Brisbois, E. J. Increasing the Lifetime of Insulin Cannula with Antifouling and Nitric Oxide Releasing Properties. *ACS Appl. Bio Mater.* **2019**, *2* (12), 5965–5975. <https://doi.org/10.1021/acscami.9b00908>.
- (47) Gao, P.; Qiu, H.; Xiong, K.; Li, X.; Tu, Q.; Wang, H.; Lyu, N.; Chen, X.; Huang, N.; Yang, Z. Metal-Catechol-(Amine) Networks for Surface Synergistic Catalytic Modification: Therapeutic Gas Generation and Biomolecule Grafting. *Biomaterials* **2020**, *248*, 119981. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119981>.
- (48) Neufeld, M. J.; Lutzke, A.; Jones, W. M.; Reynolds, M. M. Nitric Oxide Generation from Endogenous Substrates Using Metal–Organic Frameworks: Inclusion within Poly(Vinyl Alcohol) Membranes To Investigate Reactivity and Therapeutic Potential. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (41), 35628–35641. <https://doi.org/10.1021/acscami.7b11846>.
- (49) Wonoputri, V.; Gunawan, C.; Liu, S.; Barraud, N.; Yee, L. H.; Lim, M.; Amal, R. Copper Complex in Poly(Vinyl Chloride) as a Nitric Oxide-Generating Catalyst for the Control of Nitrifying Bacterial Biofilms. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (40), 22148–22156. <https://doi.org/10.1021/acscami.5b07971>.
- (50) Zhao, Q.; Fan, Y.; Zhang, Y.; Liu, J.; Li, W.; Weng, Y. Copper-Based SURMOFs for Nitric Oxide Generation: Hemocompatibility, Vascular Cell Growth, and Tissue Response. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (8), 7872–7883. <https://doi.org/10.1021/acscami.8b22731>.
- (51) Wonoputri, V.; Gunawan, C.; Liu, S.; Barraud, N.; Yee, L. H.; Lim, M.; Amal, R. Iron Complex Facilitated Copper Redox Cycling for Nitric Oxide Generation as Nontoxic Nitrifying Biofilm Inhibitor. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (44), 30502–30510. <https://doi.org/10.1021/acscami.6b10357>.

- (52) Li, X.; Shen, F.; Wang, K.; Lin, S.; Zhou, L.; Chen, S.; Wang, J.; Huang, N. Endothelial Mimetic Multifunctional Surfaces Fabricated *via* Polydopamine Mediated Copper Immobilization. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6* (46), 7582–7593. <https://doi.org/10.1039/C8TB01976B>.
- (53) Song, Q.; Li, L.; Xiong, K.; Tian, W.; Lu, J.; Wang, J.; Huang, N.; Tu, Q.; Yang, Z. A Facile Dopamine-Mediated Metal-Catecholamine Coating for Therapeutic Nitric Oxide Gas Interface-Catalytic Engineering of Vascular Devices. *Biomater. Sci.* **2019**, *7* (9), 3741–3750. <https://doi.org/10.1039/C9BM00017H>.
- (54) Yang, Z.; Yang, Y.; Xiong, K.; Wang, J.; Lee, H.; Huang, N. Metal-Phenolic Surfaces for Generating Therapeutic Nitric Oxide Gas. *Chem. Mater.* **2018**, *30* (15), 5220–5226. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.8b01876>.
- (55) Fan, Y.; Pan, X.; Wang, K.; Wu, S.; Han, H.; Yang, P.; Luo, R.; Wang, H.; Huang, N.; Tan, W.; Weng, Y. Influence of Chirality on Catalytic Generation of Nitric Oxide and Platelet Behavior on Selenocystine Immobilized TiO₂ Films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2016**, *145*, 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.04.043>.
- (56) Qu, B.; Yuan, L.; Li, J.; Wang, J.; Lv, H.; Yang, X. Selenium-Containing Polyurethane with Elevated Catalytic Stability for Sustained Nitric Oxide Release. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7* (1), 150–156. <https://doi.org/10.1039/C8TB02264J>.
- (57) Tang, D.; Chen, S.; Hou, D.; Gao, J.; Jiang, L.; Shi, J.; Liang, Q.; Kong, D.; Wang, S. Regulation of Macrophage Polarization and Promotion of Endothelialization by NO Generating and PEG-YIGSR Modified Vascular Graft. *Materials Science and Engineering: C* **2018**, *84*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.11.005>.
- (58) Jin, S.; Huang, J.; Chen, X.; Gu, H.; Li, D.; Zhang, A.; Liu, X.; Chen, H. Nitric Oxide-Generating Antiplatelet Polyurethane Surfaces with Multiple Additional Biofunctions via Cyclodextrin-Based Host–Guest Interactions. *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3* (1), 570–576. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00969>.
- (59) Horcajada, P.; Gref, R.; Baati, T.; Allan, P. K.; Maurin, G.; Couvreur, P.; Férey, G.; Morris, R. E.; Serre, C. Metal–Organic Frameworks in Biomedicine. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (2), 1232–1268. <https://doi.org/10.1021/cr200256v>.
- (60) Chaudiere, J.; Courtin, O.; Leclaire, J. Glutathione Oxidase Activity of Selenocystamine: A Mechanistic Study. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1992**, *296* (1), 328–336. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90580-P](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90580-P).
- (61) Qu, B.; Yuan, L.; Li, J.; Wang, J.; Lv, H.; Yang, X. Selenium-Containing Polyurethane with Elevated Catalytic Stability for Sustained Nitric Oxide Release. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7* (1), 150–156. <https://doi.org/10.1039/C8TB02264J>.
- (62) Ren, T.; Mao, Z.; Guo, J.; Gao, C. Directional Migration of Vascular Smooth Muscle Cells Guided by a Molecule Weight Gradient of Poly(2-Hydroxyethyl Methacrylate) Brushes. *Langmuir* **2013**, *29* (21), 6386–6395. <https://doi.org/10.1021/la4004609>.
- (63) Gu, H.; Chen, X.; Yu, Q.; Liu, X.; Zhan, W.; Chen, H. A Multifunctional Surface for Blood Contact with Fibrinolytic Activity, Ability to Promote Endothelial Cell and Inhibit Smooth Muscle Cell Adhesion. *10*.
- (64) Alagem-Shafir, M.; Kivovich, E.; Tzchori, I.; Lanir, N.; Falah, M.; Flugelman, M. Y.; Dinnar, U.; Beyar, R.; Lotan, N.; Sivan, S. S. The Formation of an Anti-Restenotic/Anti-

- Thrombotic Surface by Immobilization of Nitric Oxide Synthase on a Metallic Carrier. *Acta Biomaterialia* **2014**, *10* (5), 2304–2312. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.043>.
- (65) Winther, A. K.; Fejerskov, B.; ter Meer, M.; Jensen, N. B. S.; Dillion, R.; Schaffer, J. E.; Chandrawati, R.; Stevens, M. M.; Schultze Kool, L. J.; Simonsen, U.; Zelikin, A. N. Enzyme Prodrug Therapy Achieves Site-Specific, Personalized Physiological Responses to the Locally Produced Nitric Oxide. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (13), 10741–10751. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b01658>.
- (66) Gunasekera, B.; Abou Diwan, C.; Altawallbeh, G.; Kalil, H.; Maher, S.; Xu, S.; Bayachou, M. Functional Layer-by-Layer Thin Films of Inducible Nitric Oxide (NO) Synthase Oxygenase and Polyethylenimine: Modulation of Enzyme Loading and NO-Release Activity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (9), 7745–7755. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b17575>.
- (67) Rath, M.; Maller, I.; Kropf, P.; Closs, E. I.; Munder, M. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front. Immunol.* **2014**, *5*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>.
- (68) Abu-Soud, H. M.; Gachhui, R.; Raushel, F. M.; Stuehr, D. J. The Ferrous-Dioxy Complex of Neuronal Nitric Oxide Synthase. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272* (28), 17349–17353. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17349>.
- (69) Kone, B. C.; Kunczewicz, T.; Zhang, W.; Yu, Z.-Y. Protein Interactions with Nitric Oxide Synthases: Controlling the Right Time, the Right Place, and the Right Amount of Nitric Oxide. *Renal Physiol* **2003**, *285*, 13.
- (70) Vaughn, M. W.; Kuo, L.; Liao, J. C. Estimation of Nitric Oxide Production and Reactionrates in Tissue by Use of a Mathematical Model. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **1998**, *274* (6), H2163–H2176. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.274.6.H2163>.
- (71) Winther, A. K.; Fejerskov, B.; ter Meer, M.; Jensen, N. B. S.; Dillion, R.; Schaffer, J. E.; Chandrawati, R.; Stevens, M. M.; Schultze Kool, L. J.; Simonsen, U.; Zelikin, A. N. Enzyme Prodrug Therapy Achieves Site-Specific, Personalized Physiological Responses to the Locally Produced Nitric Oxide. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (13), 10741–10751. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b01658>.
- (72) Pant, J.; Goudie, M. J.; Hopkins, S. P.; Brisbois, E. J.; Handa, H. Tunable Nitric Oxide Release from *S*-Nitroso-*N*-Acetylpenicillamine via Catalytic Copper Nanoparticles for Biomedical Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (18), 15254–15264. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b01408>.
- (73) Singha, P.; Workman, C. D.; Pant, J.; Hopkins, S. P.; Handa, H. Zinc-oxide Nanoparticles Act Catalytically and Synergistically with Nitric Oxide Donors to Enhance Antimicrobial Efficacy. *J. Biomed. Mater. Res.* **2019**, *107* (7), 1425–1433. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36657>.
- (74) Mondal, A.; Douglass, M.; Hopkins, S. P.; Singha, P.; Tran, M.; Handa, H.; Brisbois, E. J. Multifunctional *S*-Nitroso-*N*-Acetylpenicillamine-Incorporated Medical-Grade Polymer with Selenium Interface for Biomedical Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (38), 34652–34662. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b10610>.
- (75) Huang, S.; Liu, H.; Liao, K.; Hu, Q.; Guo, R.; Deng, K. Functionalized GO Nanovehicles with Nitric Oxide Release and Photothermal Activity-Based Hydrogels for

Bacteria-Infected Wound Healing. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, acsami.0c04080. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c04080>.

(76) Hibbard, H. A. J.; Reynolds, M. M. Enzyme-Activated Nitric Oxide-Releasing Composite Material for Antibacterial Activity Against Escherichia Coli. *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, 3 (8), 5367–5374. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00670>.

(77) Lee, W. H.; Ren, H.; Wu, J.; Novak, O.; Brown, R. B.; Xi, C.; Meyerhoff, M. E. Electrochemically Modulated Nitric Oxide Release From Flexible Silicone Rubber Patch: Antimicrobial Activity For Potential Wound Healing Applications. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2016**, 2 (9), 1432–1435. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.6b00360>.

(78) Hibbard, H. A. J.; Reynolds, M. M. Enzyme-Activated Nitric Oxide-Releasing Composite Material for Antibacterial Activity Against Escherichia Coli. 8.

1.5 Biocompatibilité sanguine

Un stent est défini comme étant un DMI de classe III d'après la directive européenne 93/42/CEE³⁹. Il est donc considéré comme étant un dispositif à risque élevé ce qui impose lors de son développement une étude détaillée de son interaction avec le compartiment sanguin. Les systèmes protéiques de la coagulation (voie intrinsèque et extrinsèque de la cascade de la coagulation) et de l'immunité (système du complément)⁴⁰ vont interagir avec les surfaces des matériaux implantés, considérés comme étrangers⁴¹ à l'organisme. La surface du matériau interagira également avec les cellules circulantes (érythrocytes, thrombocytes et leucocytes) et les cellules de la paroi vasculaire (cellules endothéliales). Au niveau moléculaire, la voie intrinsèque est la plus directement impliquée dans la coagulation déclenchée par une surface étrangère⁴¹. Il en résulte une cascade d'amplification de réaction enzymatique, conduisant à l'activation de la thrombine (à partir de sa forme inactive la prothrombine) qui convertit le fibrinogène en fibrine formant le caillot en surface du matériau. D'autre part, l'adsorption protéique sur le dispositif et en particulier le fibrinogène peut conduire à l'adhésion puis à l'activation plaquettaire⁴². Dans ce contexte, les plaquettes activées subissent, entre autres, une modification morphologique conduisant à l'exposition de phospholipides accélérant la conversion de la prothrombine en thrombine⁴³. Sur le plan immunitaire, le système du complément est l'acteur principal du système immunitaire inné de l'organisme conduisant à la lyse directe du corps étranger ou au recrutement de leucocytes⁴⁴. Ce système peut s'activer selon 3 voies : la voie classique, la voie des lectines ou la voie alterne. Cette dernière, la voie alterne d'activation du complément est souvent la plus stimulée en réponse à la présence d'une surface étrangère, phénomène principalement médié par l'adsorption du complexe protéique C3b sur celle-ci⁴⁵. Ainsi le développement d'un dispositif médical doit intégrer l'étude des interactions précédemment décrites. Cela correspond à la biocompatibilité du dispositif qui s'appuie sur la norme ISO-10993-1 : 2018 « évaluation biologique des dispositifs médicaux »

⁴⁶. Elle stipule que la biocompatibilité est « la capacité d'un dispositif médical ou d'un matériau à fonctionner avec une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique ». Le challenge à relever pour créer une surface hémocompatible repose sur la création d'un matériau pouvant limiter ou inhiber les interactions à la fois aux échelles protéiques et cellulaires. Dans ce contexte, l'hémocompatibilité peut être atteinte selon deux moyens ⁴⁷. Le premier correspond à la passivation de la surface pour empêcher ou minimiser son interaction avec les constituants sanguins. Cet aspect repose sur la création d'une surface rendue furtive *via* sa composition et/ou son organisation. La stratégie la plus communément mise en œuvre repose sur la création d'une surface, via l'ajout d'une couche polymérique ⁴⁸, présentant une activité d'antifouling (résistance à l'adsorption) protéique. Les caractéristiques d'une telle surface ont été explicitées par Ostuni *et al* ⁴⁹. Ces travaux proposent que les surfaces résistantes répondent à quatre critères : elles doivent être hydrophiles, incorporer des accepteurs de liaisons hydrogène, ne pas inclure de donneurs de liaison hydrogène, et être électriquement neutres. L'efficacité de ces surfaces repose sur la création d'une couche d'hydratation formant une barrière à l'adsorption protéique ⁵⁰. L'organisation de la surface joue aussi un rôle important, l'encombrement stérique qu'elle peut offrir participe également à cet effet barrière ⁵¹. Parmi les polymères hydrophiles offrant une résistance protéique, le PEG est considéré comme étant une référence ⁶. A travers ce manuscrit l'expression « pégylation de surface » se référera à cet ajout de PEG en surface d'un matériau.

Le second moyen favorisant la biocompatibilité repose sur l'action pharmacologique de principes actifs incorporés dans la surface. Le matériau est rendu actif par son aptitude à inhiber les interactions délétères par l'utilisation de molécules biologiquement actives. Par exemple, l'immobilisation d'héparine, un anticoagulant inhibant la formation de thrombine, a été envisagée dès 1960 ⁵². De nos jours, cette stratégie représente encore une stratégie participant à l'amélioration de la biocompatibilité de biomatériaux ^{53,54}. La biocompatibilité active peut

également être atteinte par une libération de NO régulée et selon un flux d'ordre physiologique (nM). Ce composé impliqué dans l'homéostasie vasculaire ⁵⁵ présente des effets pléiotropiques pouvant favoriser l'hémocompatibilité d'une surface. En effet, le NO participe à la régulation de l'adhésion et l'activation des thrombocytes ⁵⁶ et leucocytes ⁵⁷.

Ainsi dans le cadre de ce projet, la combinaison de la pégylation de surface et de la libération de NO participe donc à la création d'une surface biocompatible vis-à-vis du compartiment sanguin aux échelles protéiques et cellulaires.

Chapitre 2 : Optimisation et caractérisation d'un revêtement formant un réservoir en monoxyde d'azote.

Au cours de ces dernières années, dans le domaine des biomatériaux, une transition s'est opérée pour passer de matériaux aux propriétés passives vers des dispositifs possédant une activité mimant les phénomènes physiologiques. On parle alors de dispositifs « actifs ». Par exemple, dans le contexte des maladies cardiovasculaires, un stent de par ses propriétés mécaniques va permettre au vaisseau de retrouver un diamètre luminal permettant la circulation sanguine. Cependant de nombreuses complications sont associées à l'utilisation de cette endoprothèse et un grand nombre de patients subira une resténose après implantation ². Plus récemment, de nombreux travaux (cf. Article 1) ont été menés pour conférer à ce dispositif médical une activité biologique permettant de mimer les fonctions d'un endothélium sain *via* la libération de molécules vasoactives dont le NO.

La stratégie que nous avons suivi au cours de ce projet repose sur le développement d'un revêtement capable de libérer du NO. La création d'un réservoir en NO mobilisable est réalisée par l'ajout d'un film multicouche fonctionnalisé sur la surface d'un stent. Les nanoparticules d'or (AuNP) immobilisées au sein du film serviront de plateformes fonctionnalisables portant le NO.

Dans ce chapitre, nous étudierons dans un premier temps la construction d'un réservoir capable de contenir les AuNP. Puis, dans une seconde partie, nous développerons les stratégies de fonctionnalisation des AuNP et du film pour l'obtention de surfaces contenant et libérant le NO.

2.1 Développement d'une stratégie analytique pour la caractérisation de films multicouches immobilisant des AuNP.

Les films multicouches sont des structures reconnues pour conférer à la surface d'un matériau des propriétés nouvelles ⁵⁸. Ils sont formés avec des polyélectrolytes positifs et négatifs en alternant les couches de charges opposées ⁵⁹. Ici, nous avons fait le choix de créer des films multicouches intégrant un troisième partenaire, les nanoparticules d'or, selon la technique du « dip coating » (enduction par trempage) dont le principe est détaillé dans la Figure 5. Avant même d'envisager l'ajout d'un principe actif au sein du film multicouche, il convient d'étudier la formation de celui-ci. Le film multicouche développé doit offrir le meilleur compromis pour deux exigences. En effet, il doit permettre l'immobilisation d'un maximum d'AuNP afin de créer un réservoir riche en NO. Aussi, il doit présenter une stabilité suffisante pour qu'aucun de ses constituants ne soit dessorbé trop rapidement en condition physiologique. L'immobilisation des AuNP de charge négative au sein du film est assurée par le biais d'interactions électrostatiques avec le polyélectrolyte positif composant la dernière couche déposée sur le film. Nous avons donc émis l'hypothèse que le polycation est le constituant du film influençant le plus le chargement des AuNP. Ainsi, la combinaison de quatre méthodes analytiques complémentaires (Figure 5) a permis de tester la quantité d'AuNP immobilisées et la stabilité pour différentes conditions de construction des films multicouches. Premièrement, par spectrophotométrie, nous avons étudié le spectre d'absorption des films dans le domaine du visible. Sous leur forme colloïdales (en suspension) les nanoparticules d'or possèdent des propriétés optiques se traduisant par une interaction avec la lumière visible. La bande de résonance plasmonique, mesurable par spectrophotométrie, correspond à la longueur d'absorption maximale des AuNP. Ce paramètre physico-chimique dépend de la taille, de la forme et de l'environnement (solvant, distance inter-particulaire...) des nanoparticules. Après immobilisation dans un film, il est intéressant de vérifier la persistance de ce paramètre et d'étudier l'allure du spectre obtenu ⁶⁰. En effet, cela permet de confirmer qu'après leur

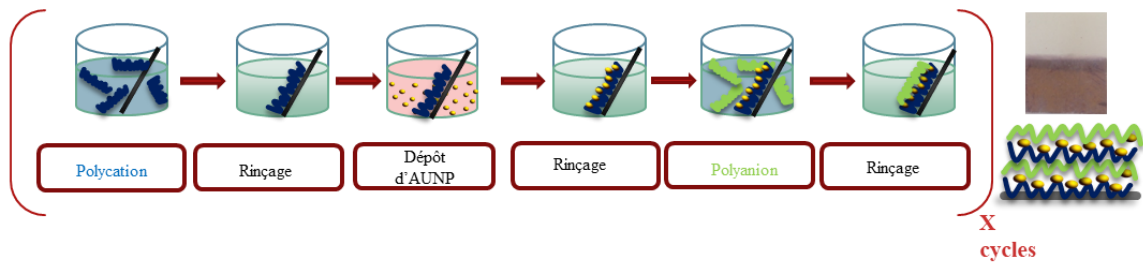
immobilisation, les AuNP restent sous forme de nanoparticules sphériques individualisées (sans agrégats). Cette information est importante puisque les AuNP doivent servir de plateformes portant le NO, ceci étant envisageable seulement avec des particules non dénaturées.

Puis, une méthode de quantification de l'or, précédemment développée au laboratoire ⁶¹, a permis de mesurer la quantité d'or totale présente dans les films multicouches. L'oxydation des AuNP d'un degré d'oxydation nul (Au⁰) en ions Au³⁺ puis leur complexation par des ions chlorure permet de former une paire d'ions entre le complexe HAuCl₄⁻ et un chromophore, la rhodamine B. Cet appariement de charge globale neutre devient alors séparable par chromatographie de partage apolaire et détectable par spectrophotométrie ou fluorimétrie. En déterminant la quantité totale d'or dans les films, il est possible d'en déduire le nombre d'AuNP immobilisées. Cette méthode permet d'étudier l'influence des conditions de construction des films sur la densité d'immobilisation des particules (AuNP/cm²). Il est ainsi possible de déterminer les conditions offrant la plus grande quantité d'AuNP qui pourront à terme former un réservoir en principe actif.

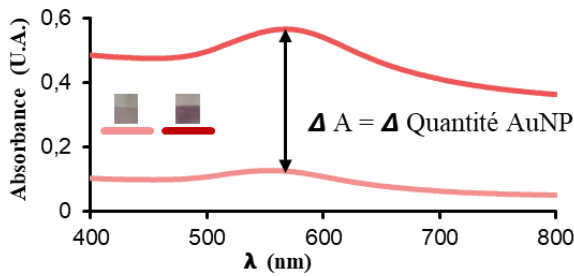
La nature de la solution tampon solubilisant les polyélectrolytes (composition, et force ionique) est également un paramètre important qui va moduler la construction du film. Des contre-ions peuvent interagir avec les différents polymères et créent ainsi des compensations de charges qui modulent la conformation des polyélectrolytes et conditionnent l'interaction des différentes couches entre elles. Le suivi de la construction des films par microbalance à quartz a permis de mesurer l'adsorption ou la désorption des polyélectrolytes constituant les films. Le quartz est un matériau piézoélectrique dont la fréquence de résonance est reliée à la masse déposée à sa surface. Enfin, les films ont également été construits sur la face interne d'un capillaire d'électrophorèse capillaire de zone (ECZ). Cette méthode analytique permet de séparer des molécules migrant selon un flux osmotique dépendant de la charge de surface du capillaire. En déterminant le temps de migration d'un marqueur de référence, les changements de charges de

surfaces apportés par chaque couche lors de la construction ont pu être déterminés. Cette méthode apporte également des informations sur la stabilité des films formés en surface des capillaires. La résistance des films aux contraintes de cisaillement générées par le flux du tampon de migration a aussi été évaluée. L'ensemble de ces travaux a abouti à la publication d'un article proposant une méthode analytique pour l'étude de la construction et de la stabilité de films multicouches immobilisant des AuNP.

Principe du dip coating :

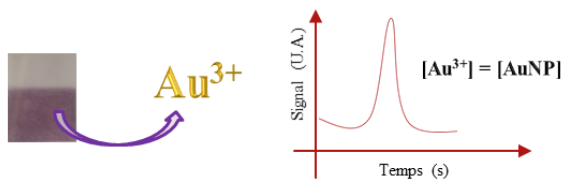


Spectrophotométrie visible :



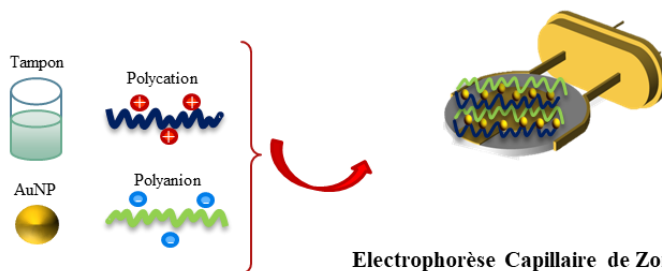
Estimation de la quantité d'AuNP et de l'homogénéité de l'immobilisation

Chromatographie Liquide Haute Performance :



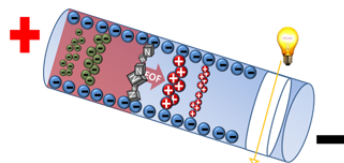
Quantification du nombre d'AuNP immobilisées par unité de surface de film

Microbalance à Cristal de Quartz (QCM) :



Suivi de l'adsorption / désorption des couches constituant le film

Electrophorèse Capillaire de Zone (ECZ) :



Stabilité du film soumis à des contraintes de cisaillement

Figure 5 : Principe de la formation des films multicouches immobilisant des AuNP par dip coating et méthodes analytiques permettant de les caractériser après formation (spectrophotométrie visible et chromatographie liquide haute performance) ou de suivre chaque étape de la construction du film (QCM, ECZ).

Article 2: Analytical strategy for studying the formation and stability of multilayered films containing gold nanoparticles

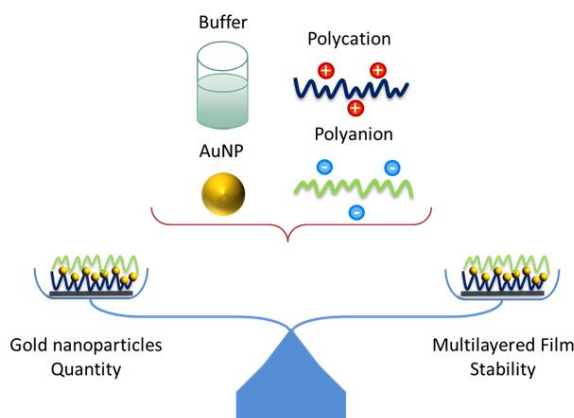
L'article 2 présente une stratégie analytique permettant de sélectionner les conditions de construction des films multicouches pour favoriser la quantité d'AuNP immobilisées et la stabilité de l'ensemble de la construction.

Cet article a été publié dans le journal *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (I.F. = 4.142).

Arnaud Pallotta, Igor Clarot, **Jordan Beurton**, Benjamin Creusot, Thomas Chaigneau, Annie Tu, Philippe Lavalle & Ariane Boudier

Analytical and Bioanalytical Chemistry volume 413, pages 1473–1483 (2021)

Graphical Abstract:



ANALYTICAL STRATEGY FOR STUDYING THE FORMATION AND STABILITY OF MULTILAYERED FILMS CONTAINING GOLD NANOPARTICLES

Arnaud PALLOTTA¹, Igor CLAROT¹, Jordan BEURTON¹⁻², Benjamin CREUSOT¹, Thomas CHAIGNEAU¹, Annie TU²⁻³, Philippe LAVALLE²⁻³ and Ariane BOUDIER^{*1}

1: Université de Lorraine, CITHEFOR, F-54000 Nancy, France.

2: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM Unité 1121, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France

3: Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, 8 rue Sainte Elisabeth, 67000 Strasbourg, France.

* Contact: +33(0) 372 747 228, ariane.boudier@univ-lorraine.fr

ORCID Id:

Arnaud PALLOTTA 0000-0001-5194-8748, Igor CLAROT 0000-0001-9083-601X, Jordan BEURTON 0000-0002-2323-1907, Benjamin CREUSOT, Thomas CHAIGNEAU 0000-0003-4169-5614, Annie TU 0000-0001-7036-2080, Philippe LAVALLE 0000-0001-8798-912X, Ariane BOUDIER 0000-0001-5975-3646.

Abstract:

The design of layer-by-layer (LbL) polyelectrolyte films including nanoparticles is a growing field of innovation in a wide range of biomedical applications. Gold nanoparticles (AuNPs) are very attractive for further biomolecule coupling to induce a pharmacological effect. Nanostructured LbL films coupled with such metallic species show properties that depend on the conditions of construction, *i.e.*, the polymer nature and dissolution buffer. Tripartite LbL films (polycation, AuNP, and polyanion) were evaluated using two different polycationic polymers (poly(allylamine hydrochloride) (PAH), poly(ethylene imine) (PEI)) and various medium conditions (salts, *i.e.*, phosphate, Tris or Tris-NaCl buffers, and concentration). AuNP incorporation and film stability were analyzed by visible spectrophotometry, capillary zone electrophoresis, a quartz crystal microbalance, and high-performance liquid chromatography. The ideal compromise between AuNP loading and film stability was obtained using PAH prepared in Tris-NaCl buffer (0.01 M – 0.15 M). This condition allowed the formation of a LbL film that was more stable than the film with PEI and provided an AuNP quantity that was 4.8 times greater than that of the PAH-PBS-built film. In conclusion, this work presents an analytical strategy for the characterization of nanostructured multilayer films and optimization of LbL films enriched with AuNPs to design biomedical device coatings.

Keywords: Polyelectrolyte films, gold nanoparticles, film stability, nanoparticle loading, dynamic models, physicochemical evaluation

1. Introduction

Polyelectrolyte layer-by-layer (LbL) films are promising coatings for applications in medical devices. They are composed of different polymers self-assembled through electrostatic bonds between polyelectrolytes with opposite charges. They can include drugs to induce a specific therapeutic effect. However, these films show some limitations for long-term drug release.(Acharya, Lee, and Lee 2012) To overcome this problem, two methods can be applied or even coupled. The first one corresponds to the development of hierarchically assembled films.(Garza et al. 2004; Kim et al. 2009; Pavlukhina and Sukhishvili 2011) Stratified films including barrier layers will lead to a gradual release of the drug depending on external conditions such as pH, temperature, or salt concentration. The second one deals with a mechanical increase in the reservoir capacity through its enrichment with nanoparticles (NPs) directly interacting with polymers.(Pallotta et al. 2019) In this case, the selected coating conditions (polyelectrolytes and media) seem to play a major role in film construction and stability.(Diamanti et al. 2016, 2017) In addition to prolonged/controlled drug release, nanoparticle inclusion into LbL films was also described to confer specific properties to the coating, such as antibacterial activity by the addition of silver NPs,(Liu et al. 2013; Liu, Chen, and Kim 2012; Wang et al. 2015) theranostic platforms using ferrous magnetic NPs,(Kim et al. 2013) or even sensors *via* the inclusion of gold nanoparticles (AuNPs).(Li et al. 2011; Tian et al. 2004) Recently, AuNPs were entrapped inside multilayered polyelectrolyte films for the development of a biocompatible material.(Pallotta et al. 2017) These particles were chosen for their high capacity to be grafted with active pharmaceutical ingredients, which would allow the formation of a large drug reservoir. However, to the best of our knowledge, no work has focused on optimizing the stability and AuNP enrichment of tripartite LbL films (*i.e.*, polycation/AuNP/polyanion). This organization creates a film characterized by a dense

electrostatic binding network that is able to anchor nano-objects and avoid any release of particles into the external medium¹⁴.

The aim of this paper required optimizing the design of NP-enriched LbL films using a step-by-step analytical strategy. Based on a tripartite system (polycation/negatively charged AuNP/polyanion), two main parameters were addressed: i) the nature of the polycation and ii) the nature and concentration of the salt used in the buffer for LbL film construction. As a hypothesis, the number of charges on the polycationic species should be a key parameter affecting the amount of immobilized AuNPs inside the films. Herein, we tested 2 different polycations (Table 1): two hydrophilic polymers (poly(allylamine hydrochloride) (PAH) and poly(ethylene imine) (PEI)). Recent papers have noted the important role of phosphate ions in LbL disorganization.(Diamanti et al. 2016, 2017) Three different buffers were evaluated in this work (Table 1): phosphate buffered saline solution (PBS) was used as the reference buffer (the buffer used to model physiological conditions), Tris buffer (with the same pH and concentration but a different ionic strength) and Tris-NaCl buffer (with the usual Tris concentration found in the literature (0.01 M) with an additional physiological salt concentration (0.15 M))(Mertz et al. 2011; Yoshida et al. 2018). To evaluate their formation, films were built according to different methodologies: a static film was prepared on cover glasses using the classical dip-coating method (Decher 1997); and two dynamic deposition methods using capillary zone electrophoresis (CZE) and quartz crystal microbalance (QCM) (Table 2) were used to provide complementary information. The requirements to define the best conditions relied on the compromise between the density of entrapped NPs and the film stability. Indeed, for future biomedical applications, mechanical constraints (blood flow, muscle contractions, etc.) encountered by medical devices are mandatory prerequisites. Therefore, the design of nanostructured films must lead to a stable coating without any NP/film leakage.

Table 1: Characteristics of the reagents used in this study

Polycation	Function carrying charge	pKa at 25 °C	Organization	Solubility	Average Molecular mass	Concentration used
PAH	Primary Amine	8.7	Linear	Water soluble	17,500	0.1 M (according to monomer molecular masses)
PEI	Primary Amine	3.3, 6.7, 9.2, 9.9	Branched		800,000	
Buffers	pH	Acids/Basis	pKa at 25 °C	Concentrations (M)	Ions	
PBS	7.4	H ₃ PO ₄ / H ₂ PO ₄ ⁻	2.1	0.15	Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ ,	
		H ₂ PO ₄ ⁻ /HPO ₄ ²⁻	7.2		H ₂ PO ₄ ⁻ ,	
		HPO ₄ ²⁻ /PO ₄ ³⁻	12.3		HPO ₄ ²⁻	
Tris	7.4	C ₄ H ₁₂ NO ₃ ⁺ /C ₄ H ₁₁ N	8.1	0.15	C ₄ H ₁₂ NO ₃ ⁺ , Cl ⁻	
Tris- NaCl			O ₃		0.01/0.15	C ₄ H ₁₂ NO ₃ ⁺ , Na ⁺ , Cl ⁻
Physicochemical parameter	λ max (nm)	Hydrodynamic diameter (nm)	Core diameter (nm)	Zeta potential (mV)	Stabilizer	
AuNP	514 ± 1	5.8 ± 0.9	2.7 ± 0.8	-32 ± 1	Citrate ions	

Table 2: Analytical methods used to characterize the film stability and AuNP enrichment

	Analytical methods			
	Spectrophotometry	HPLC (Pallotta et al. 2018)	CZE (Pallotta et al. 2017)	QCM
AuNP quantity	+	++	±	+
Film stability	-	-	++	++
Information	Step-by-step monitoring of AuNP immobilization	AuNP quantification	Surface charge	Film components adsorption and desorption
Advantages	Non destructive Allows for quick and simple monitoring	Quantitative method	Step-by-step monitoring Stability under dynamic conditions	Mass deposition (ng/cm ²) quantification Stability under static conditions
Drawbacks	Rough estimation of AuNP quantity	Sample destruction	Time consuming	

2. Experimental

2.1 Reagents and AuNP synthesis

Poly(allylamine hydrochloride) powder (PAH) with an average molecular mass of 17,500, 35 wt% poly(acrylate, sodium salt) (PAA) solution with an average molecular mass of 15,000 in water and 50 wt% branched poly(ethylene imine) (PEI) solution with an average molecular mass of 800,000 in water were purchased from Sigma Aldrich. Solutions of 1.0 M HCl obtained from Fluka were used for pH adjustment. Sodium dodecyl sulfate (SDS) was supplied by Eurobio. Phosphate buffered saline solution (148 mM PBS) was prepared as follows: $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 6.48 \text{ mM}$, $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 1.47 \text{ mM}$, $[\text{NaCl}] = 138 \text{ mM}$ and $[\text{KCl}] = 2.68 \text{ mM}$. The final pH was adjusted to 7.4 with 1.0 M NaOH. Tris solution (148 mM) was prepared from Trizma® base (Sigma Aldrich), and the final pH was adjusted to 7.4 with 1.0 M HCl. Tris-NaCl buffer was prepared by adding 150 mM NaCl to 10 mM Trizma® base, and the final pH was adjusted to 7.4 with 1.0 M HCl. All other reagents were supplied by Sigma Aldrich and were of analytical grade. Ultrapure deionized water ($>18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) was used to prepare all the solutions.

Citrate-stabilized AuNPs were synthesized according to previous works.(Tournebize et al. 2012) Briefly, 1 mL of AuCl_4^- aqueous solution (10 mg/mL) was added into 90 mL of water containing 2 mL of 55 mM sodium citrate. The solution was stirred for 1 min (250 rpm), 1 mL of NaBH_4 (19.5 mM) was added, and the solution was stirred for 5 min under nitrogen. AuNPs with a gold core diameter of $3 \pm 1 \text{ nm}$, $514 \pm 1 \text{ nm}$ specific plasmon band and a negative zeta potential of $-32 \pm 1 \text{ mV}$ were obtained in accordance with previous results.(Pallotta et al. 2016; Tournebize et al. 2012) The resulting suspension was immediately stored in the dark at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ for a maximum of 20 days.

2.2 Multilayered film production

The glass substrates used for deposition ($24 \times 36 \times 0.145$ mm, Menzel-Glaser) were used after a strict cleaning procedure was performed: 0.1 M SDS at 100 °C for 15 min, followed by extensive rinsing with water. They were then immersed in 0.1 M HCl at 100 °C for 15 min, extensively rinsed with ultrapure deionized water (>18.2 M Ω -cm) and finally dried at room temperature.

Polyelectrolyte solutions (0.1 M either in PBS in Tris or in Tris-NaCl, according to monomer molecular masses) were prepared freshly before each experiment. The addition of 1.0 M HCl to the PAA solution was required to adjust the pH to 7.4. The construction of the AuNP/polymer LbL film was carried out as follows. A pre-treated cover glass was dipped in the polycation solution for 10 min and then rinsed with the buffer (*e.g.*, PBS) for 3 min. Subsequently, the slide was immersed in the AuNP suspension for 10 min, rinsed as previously described, dipped in the PAA solution for 10 min and rinsed. The AuNP-incorporated polymer multilayer film was obtained by repeating this simple three-step process with cyclic repetition. In this study, a layer is defined as the product of depositing polycations, AuNPs or polyanions, and a cycle is the consecutive deposition of those 3 different reagents. Two different polycations were tested to build the films: PAH or PEI. For films prepared in Tris or Tris-NaCl, polycation and polyanion solutions (0.1 M) and rinsing baths were realized with Tris (0.15 M) and Tris-NaCl (0.01 M - 0.15 M) buffers. The constructed films are defined in the text as a combination of the polycation and the buffer used, for example, the PAH/PBS-built film.

Absorbance spectra (400-700 nm) of the coated slides (*vs.* an uncoated pre-cleaned slide) were recorded with a UV-1800 apparatus (Shimadzu).

2.3 Gold quantification

Gold quantification was described elsewhere.(Pallotta et al. 2018) Briefly, cover glasses were crushed with a glass rod, transferred into a LoBind Eppendorf® tube and mixed with an oxidant solution (400 μL of 1.0 M-0.3 M-0.025 M HCl-NaCl-Br₂ solution, respectively) for 20 min. The mixture was then partially evaporated using a Turbovap (Biotage) at 40 °C under inert gas (N₂, 4 psi) for 20 min. Then, 200 μL of NH₄Cl solution (30% m/V), 100 μL of 6 M HCl and 100 μL of rhodamine B solution (0.084 μM) were added. The ion pair formed between the tetraurochlorate anion and rhodamine B was extracted by 200 μL of diisopropyl ether. Tubes were agitated on a Vibramax 100 shaker (Heidolf Instruments) for 3 min at 1500 rpm and then centrifuged (Mini Spin Plus, Eppendorf) for 3 min at 12100 $\times g$. Then, 150 μL of the supernatant (organic phase) was withdrawn and completely evaporated (Turbovap, 5 min, N₂, 3 psi), and the dried residue was dissolved in the mobile phase (150 μL) before injection into the HPLC system. HPLC analyses were carried out on a SpectraSystem instrument composed of a vacuum degasser (SCM1000), a quaternary pump (P1000XP), an autosampler (AS300) and a UV-Visible detector (UV2000). The column (Nucleosil ® C18, 150 mm \times 4.6 mm, 3 μm particle size and 100 Å porosity) was thermostated at 40 °C using a Croco-cil (1267) oven. Data acquisition and injection control were performed by Azur software (version 5.0, Datalys®). The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile and water (25/75, V/V) containing 0.1% trifluoroacetic acid. The injection volume was 20 μL . The detector was set at 555 nm, and the pump was set at a flow rate of 1.0 mL.min⁻¹.

2.4 Quartz crystal microbalance

QCM measurements were conducted with an E1 QCM-D instrument at 21 °C, and SiO₂-coated (50 nm) quartz crystals (5 MHz) from Q-Sense were employed. Initially, crystals were cleaned using a plasma cleaner (PDC-32G-2 Harris Plasma®) for 15 min. Then, LbL films were assembled inside the QCM chamber. For each layer deposition cycle, 500 μL of polycation

solution (either PAH or PEI), AuNPs or PAA solutions were introduced into the chamber (with a flow rate of $400 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) for 5 to 10 min until stable frequency values were attained. Each deposited layer was then rinsed with the appropriate buffer (PBS, Tris or Tris NaCl).

The crystal was excited at its fundamental frequency (approximately 5 MHz), and observation took place at the third, fifth and seventh overtones (ν) (corresponding to 15, 25 and 35 MHz, respectively).

2.5 Capillary zone electrophoresis

All experiments were performed on a Beckman P/ACE 5500 model (Beckman, Fullerton, USA) equipped with a UV detector set at $\lambda = 214 \text{ nm}$ in normal polarity mode (anodic injection) for positive mobilities. Negative mobility values were evaluated in reverse polarity mode (electrode reversal). The capillary temperature was controlled by a coolant at $25.0 \text{ }^\circ\text{C}$. Untreated fused-silica capillaries with a $75 \mu\text{m}$ internal diameter and a total length of 37 cm (effective length: 30 cm) were employed. The neutral marker benzyl alcohol solution ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in background electrolyte, BGE) was injected in hydrodynamic mode (3 s under pressure, 0.5 psi). The experimental setup, data acquisition, and processing were governed using Beckman P/ACE Station software. The BGE used to evaluate the migration times was phosphate background buffer (15 mM, pH = 7.4). Before the first use, each new capillary was rinsed with 1.0 M sodium hydroxide (20 min) and ultrapure water (20 min). Each injection was performed in triplicate, and the results are indicated as the mean and standard deviation. The polyelectrolyte solutions (either in PBS, Tris or Tris NaCl) used to coat the capillary were those described in the cover glass section. The deposition method was adapted from previous work.(Pallotta et al. 2017) Briefly, for each layer, the capillary was first filled with the coating solution (polymers or AuNPs) at 20 psi for 10 min and rinsed with nitrogen and ultrapure water after 1 h of deposition. Between each layer, neutral benzyl alcohol was injected three times, and before each injection,

the capillary was successively rinsed with ultrapure water (2 min) and BGE (3 min). The electro-osmotic flow (EOF) mobility (μ_{EOF}) was determined using the neutral marker migration time (NMT) and Equation 1:

$$\mu_{EOF} = \frac{L \times l}{NMT \times V} \quad (\text{Equation 1})$$

where L and l are the total and apparent lengths of the capillary (length to detection), and V is the applied voltage.

3. Results and discussion

This study aimed to determine the ideal combination of polycation and buffer to ensure the formation of a stable nanostructured multilayered film.

The two tested polymers (PAH and PEI) were chosen for their ability to carry positive charges through primary amines and to make electrostatic bonds with negatively charged AuNPs. Linear PAH was our reference polymer since it was used to prepare AuNP-entrapped LbL films in our previous studies.(Beurton et al. 2019; Pallotta et al. 2017) Its primary amine presents an ionization constant (pKa) equal to 8.7. Branched PEI, with 4 pKa values (3.3, 6.7, 9.2 and 9.9),(Suh, Paik, and Hwang 1994) is more basic than PAH and more charged at physiological pH (*i.e.*, 7.4) than PAH. With more cationic charges than PAH at physiological pH, PEI is hypothesized to develop greater interactions with AuNPs. PAH and PEI are both water soluble and commonly used in the literature to construct LbL films with or without NPs.

The influence of the polycation dissolution medium on film formation and stability was assessed using three different buffers. As the reference buffer, PBS was selected (the model buffer used for physiological conditions), followed by Tris buffer (with the same pH and concentration but a different ionic strength) and Tris-NaCl buffer (with the usual Tris concentration found in the literature (0.01 M) with an additional physiological salt concentration (0.15 M))(Mertz et al. 2011; Yoshida et al. 2018) were applied. Some papers suggest that AuNP inclusion on the film can be improved by the dissolution buffer choice.(Diamanti et al. 2016, 2017) The second specification for LbL films concerns the biological compatibility of the dissolution medium to avoid any side effects caused by the potential remaining buffer. The organic solvents frequently used for polymer dissolution or acetate buffers were voluntarily avoided for their potential toxicity or non-adapted pKa.

3.1 Influence of the cationic polymer and buffer on AuNP loading

First, focus was placed on maximizing the AuNP reservoir. AuNP loading was estimated through step-by-step monitoring of film preparation with UV-visible spectrophotometry and quantified with an HPLC-visible system. For all polycations, the LbL films were prepared on glass cover slides using the classical dipping protocol (Beurton et al. 2019; Decher 1997; Pallotta et al. 2017). Deposition cycles ([polycation/AuNP/PAA]) were repeated 3 to 5 times.

Film absorbance is linked to the optical properties of NPs. The specific plasmon band of the AuNPs persisted (Figure 1C), and no peak was observed in the range of 700 to 800 nm, which meant that AuNPs were well individualized, even after inclusion in the film. (20) This absorbance is directly related to the number of AuNPs embedded, as illustrated in Figure 1 A and B; it linearly increases for both PAH-AuNP-PAA and PEI-AuNP-PAA films ($R^2 > 0.99$). Only the PEI/PBS-built film showed no increase in absorbance, with a mean value of 0.075 ± 0.005 a.u. for each layer (3 deposited layers) (Figure 1B). This absence of an absorbance increase could be considered an absence of film building or no NP inclusion. In contrast, PEI/Tris and PEI/Tris NaCl films seem to build linearly with a strong increase in absorbance after each cycle. Moreover, the PEI/Tris NaCl film had the highest absorbance. When PAH was used, the maximal absorbance of the PAH/Tris and PAH/Tris NaCl films appeared to be 1.4 times higher than that of the PAH/PBS film (Figure 1 and Table 3). However, this parameter only gives a rough estimation of the quantity of AuNPs in the film. For example, it does not consider the homogeneity of the coating. To confirm this trend, AuNP quantification was realized *via* rhodamine B ion pairing (electrostatic interactions between anionic AuCl_4^- and cationic rhodamine B) and an HPLC system using visible detection. (Pallotta et al. 2018) This quantification (Table 3) was expressed as the number of particles per unit area of film. The use of Tris buffer with or without NaCl, instead of PBS, allowed for a significant increase in the quantity of AuNPs entrapped in the LBL film for both PAH- and PEI-based films. Considering

the standard deviations obtained for each measurement, PAH and PEI films with both Tris and Tris-NaCl buffers could not be discriminated in terms of NP inclusion. For PEI-based films, a lack of stability was also observed under PBS conditions, suggesting that film stability during the construction process should also be studied and considered.

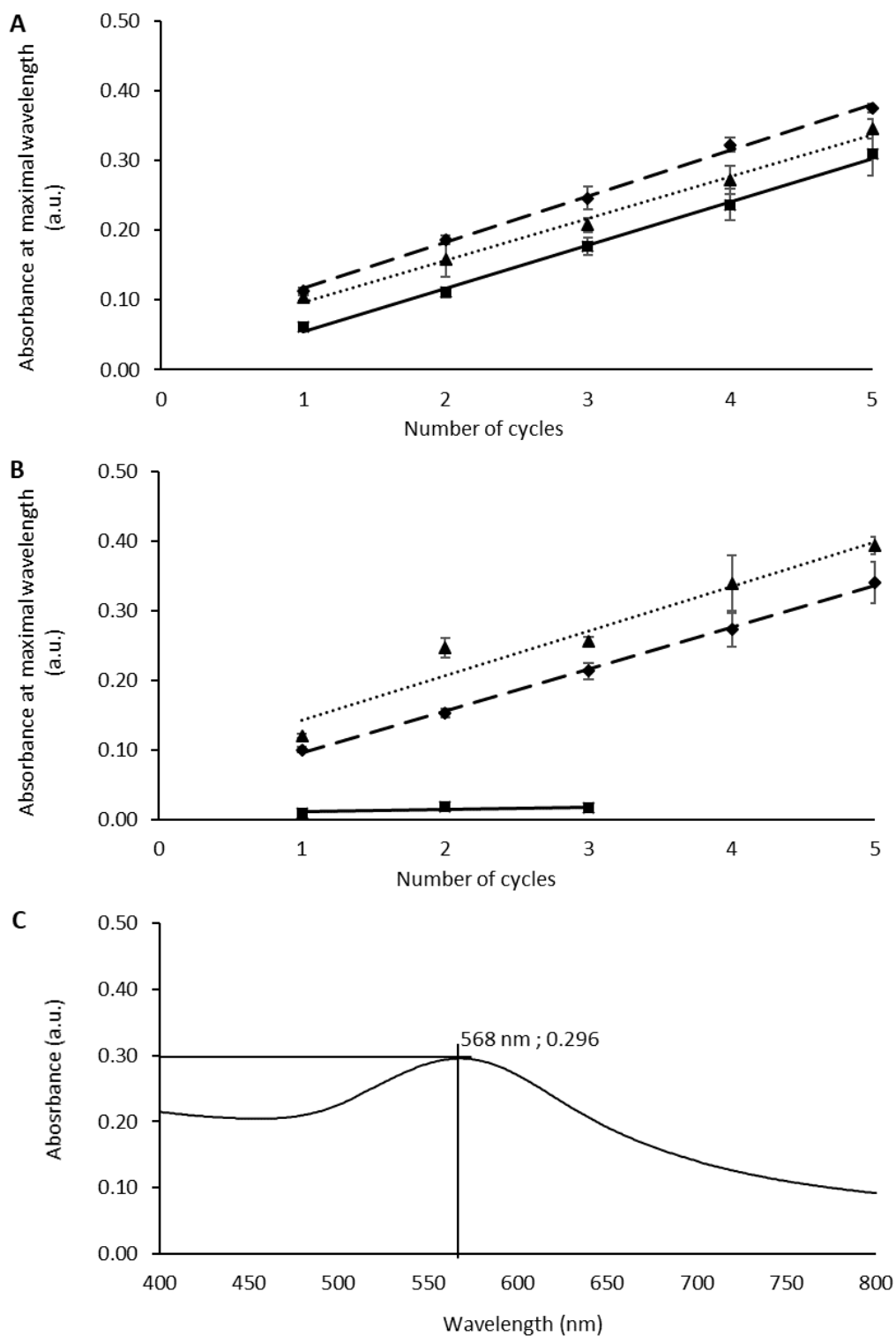


Figure 1: Variation in the absorbance obtained at the maximum wavelength plotted as a function of the number of coating cycles. (A) PAH-based films. Solid line (■), $y = 0.0621x - 0.0071$ is PAH/PBS-built films, dotted line (▲), $y = 0.06x + 0.0364$ is PAH/Tris films, and dashed line (◆) $y = 0.0661x + 0.0503$ is PAH/Tris NaCl films. (B) PEI-based films. Solid line (■), $y = 0.036x + 0.0074$ is PEI/PBS-built films, dotted line (▲) $y = 0.06x + 0.0364$ is PEI/Tris films, and dashed line (◆) $y = 0.0639x + 0.0798$ is PEI/Tris NaCl films. (C) Representative spectra of immobilized AuNPs. The spectra of a 5-cycle PAH/PBS-built film

Table 3: Number of AuNPs/cm² deposited per cycle and maximal absorbance (A_{max}, absorbance obtained at maximum wavelength) after 3 cycles of film construction under different conditions (n = 3).

Buffer	PBS		Tris		Tris-NaCl	
Polycation	PAH	PEI	PAH	PEI	PAH	PEI
AuNP/cm ² /cycl e (×10 ¹²)	1.0 ± 0.1	N.D.	4.8 ± 0.4	4.3 ± 0.2	4.8 ± 0.1	5.2 ± 0.7
A max	0.30 ± 0.01	N.D.	0.37 ± 0.02	0.34 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.40 ± 0.01

3.2 Influence of the cationic polymer and buffer on film formation

To consider the use of LBL films as a medical device coating, stability was a key point to study. Two complementary methods were used to study film construction under static and dynamic conditions. On the one hand, QCM allowed step-by-step monitoring of the adsorption or desorption of each deposited layer under static conditions. On the other hand, CZE was used to monitor the film surface charge and its stability after each deposition step under shear stress.

Films were built on SiO₂-coated quartz crystals with PAH or PEI and monitored with QCM. Changes in frequencies were monitored as a function of the deposition of the different layers. As illustrated by Figure 2A, in the first approximation, decreasing frequency is linked to mass deposition on the quartz crystal, while increasing frequency indicates desorption of the film on the crystal surface. Three different behaviours were observed during the constructions.

First, for the PAH/Tris-, PAH/Tris-NaCl- and PEI/Tris-NaCl-built films (Figure 3B, 3C and 3E), the classical pattern expected from an LBL building process is obtained. Each polymer and AuNP deposition led to a decrease in frequency and thus to mass deposition on the quartz surface. Then, rinsing with Tris buffers induces a small increase in frequency, indicating that few weakly attached polymeric chains or AuNPs desorbed from the surface. The overall building of the film follows the same pattern for each deposited layer. Concerning the PAH/PBS-built film, after each PAA layer deposition cycle, a strong decrease occurred (cf ①②③ in Figure 3A), followed a few seconds later by a large increase in frequency values. This pattern was repeated during each cycle and amplified over time. We hypothesized that it was caused by the formation of aggregates on the surface of the films, leading to a frequency decrease. As these aggregates were not tightly bound to the surface, they were quickly removed, explaining the increasing frequencies.

For PEI/PBS- and PEI/Tris-built films, after polycation injection, the increasing frequency is monitored (*cf* ① and ①② in Figures 3D and 3E, respectively). This is linked to a loss in mass and thus the desorption of these films. This behaviour is not observed after the addition of NaCl salt to Tris buffer (Figure 3F), where each deposition step leads to an increase in mass without any desorption. Thus, the presence of counter ions in the building medium seems to be an important factor in stabilizing the PEI-based films during construction. The growth of films composed of PAH or PEI and PAA (without NPs) usually follows a linear pattern. The expansion of these films is driven by the electrostatic interactions of the outer layer of the film and the new layer that is being deposited. The addition of negatively charged AuNPs in the building process could lead to the destabilization of this equilibrium of charges. Thus, data extracted from Figure 3 allowed us to study the growth rate of the nanostructured films as a function of the buffer and polycation used. Figure 4 represents the variation in frequency monitored through QCM analysis as a function of the deposited layer. By linear fitting the frequency variations as a function of the deposited layer, it was possible to check whether the growth rate of the films was kept linear with NP inclusion.

Tris-NaCl conditions gave better linearity ($R^2 > 0.98$, in Figure 4A and 4B) for both PAH- and PEI-based films, confirming the analysis of Figure 3C and 3F and corresponding to stable and homogeneous growth of these films (Deligöz and Tieke 2014). For the PAH/Tris-built film, an acceptable linearity ($R^2 > 0.90$, in Figure 3A) is found, while this value is significantly lower ($R^2 < 0.55$, in Figure 3B) for the PEI/Tris-built film. PAH carrying only one primary amine per monomer does not need as many counter ions as the PEI/Tris-built film to be properly stabilized.

Altogether, these results highlighted two essential characteristics of buffer selection. First, phosphate ions cannot lead to a properly constructed film. Due to their small size and their two anionic charges, phosphate ions easily diffuse through the different film layers, strongly interact

with cationic charges, and prevent strong polyanion adsorption to the polycation. As represented in Figure 2B, this results in swelling of the film and polyelectrolyte desorption. Then, the addition of counter ions to the buffer used to build the film allows stable and homogeneous growth of the multilayered film.

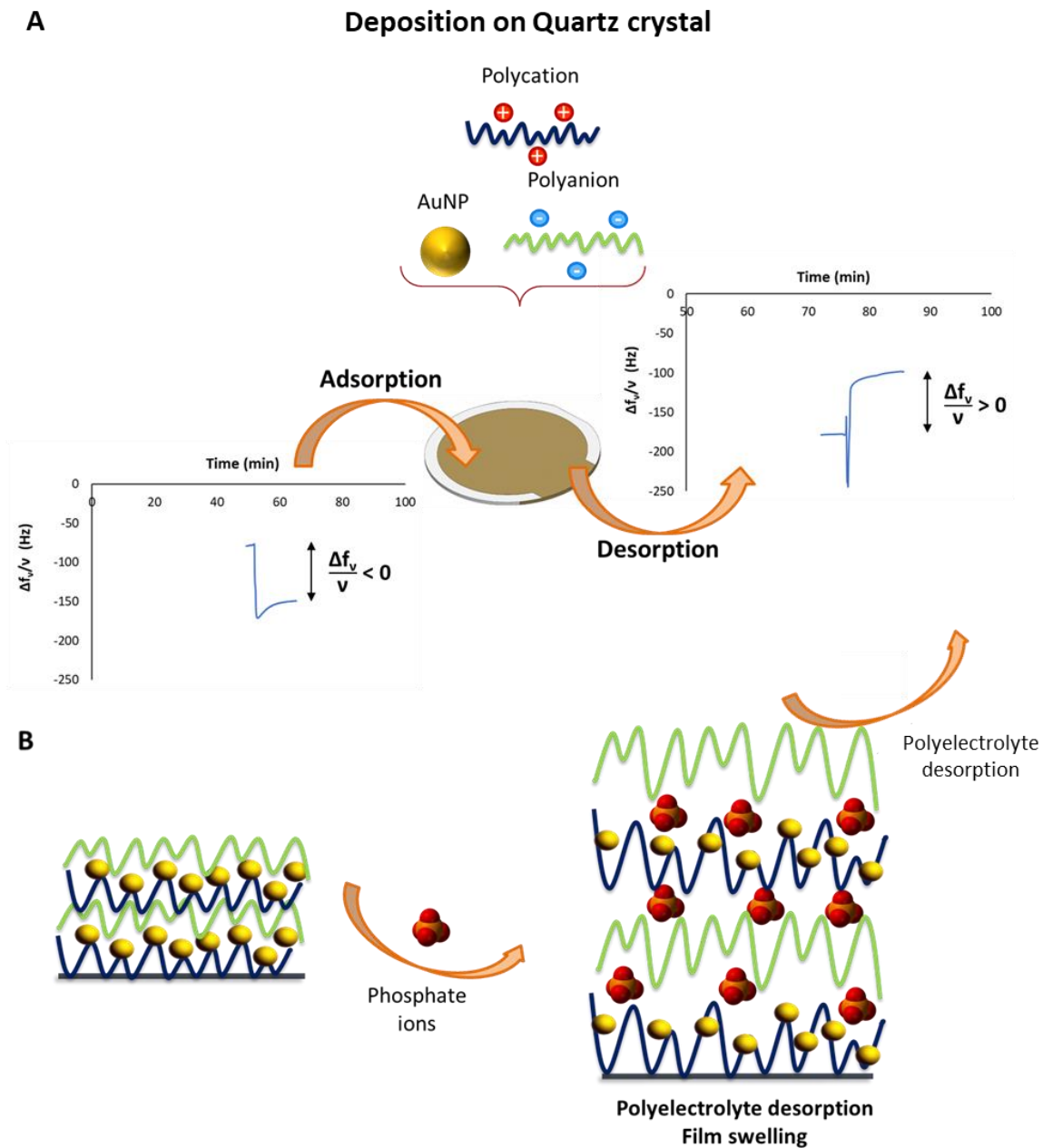


Figure 2: Schematic representation of the classical response obtained with a QCM during the construction of a multilayered film (A). Schematic representation of film swelling and desorption caused by the presence of phosphate ions (B).

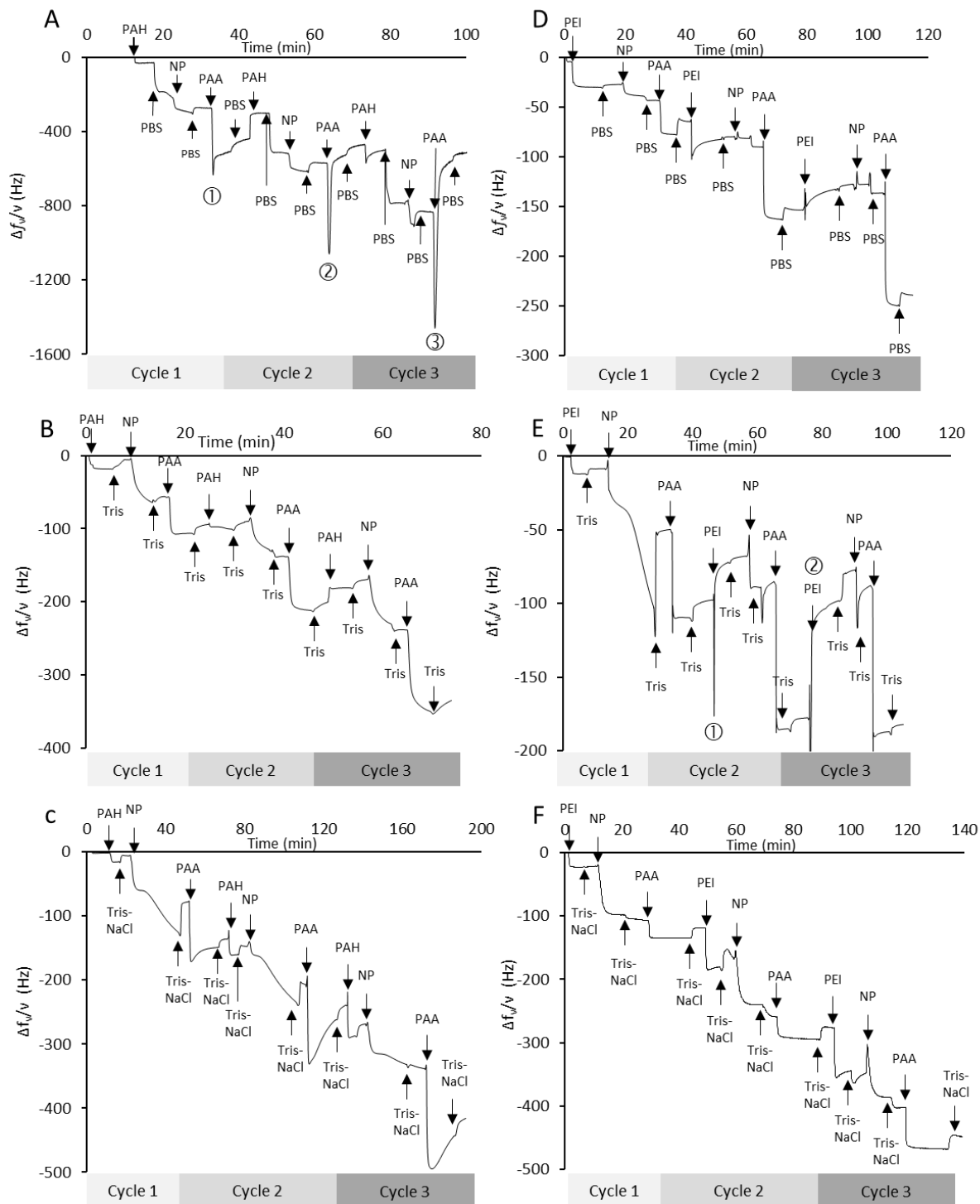


Figure 3: Normalized frequency $\Delta f_v/v$ (for $v = 3$) as a function of time monitored with a QCM during step-by-step deposition for a (A) PAH/PBS-built film, (B) PAH/Tris buffer-built film, (C) PAH/Tris-NaCl buffer-built film, (D) PEI/PBS-built film, (E) PEI/Tris buffer-built film, and (F) PEI/Tris-NaCl buffer-built

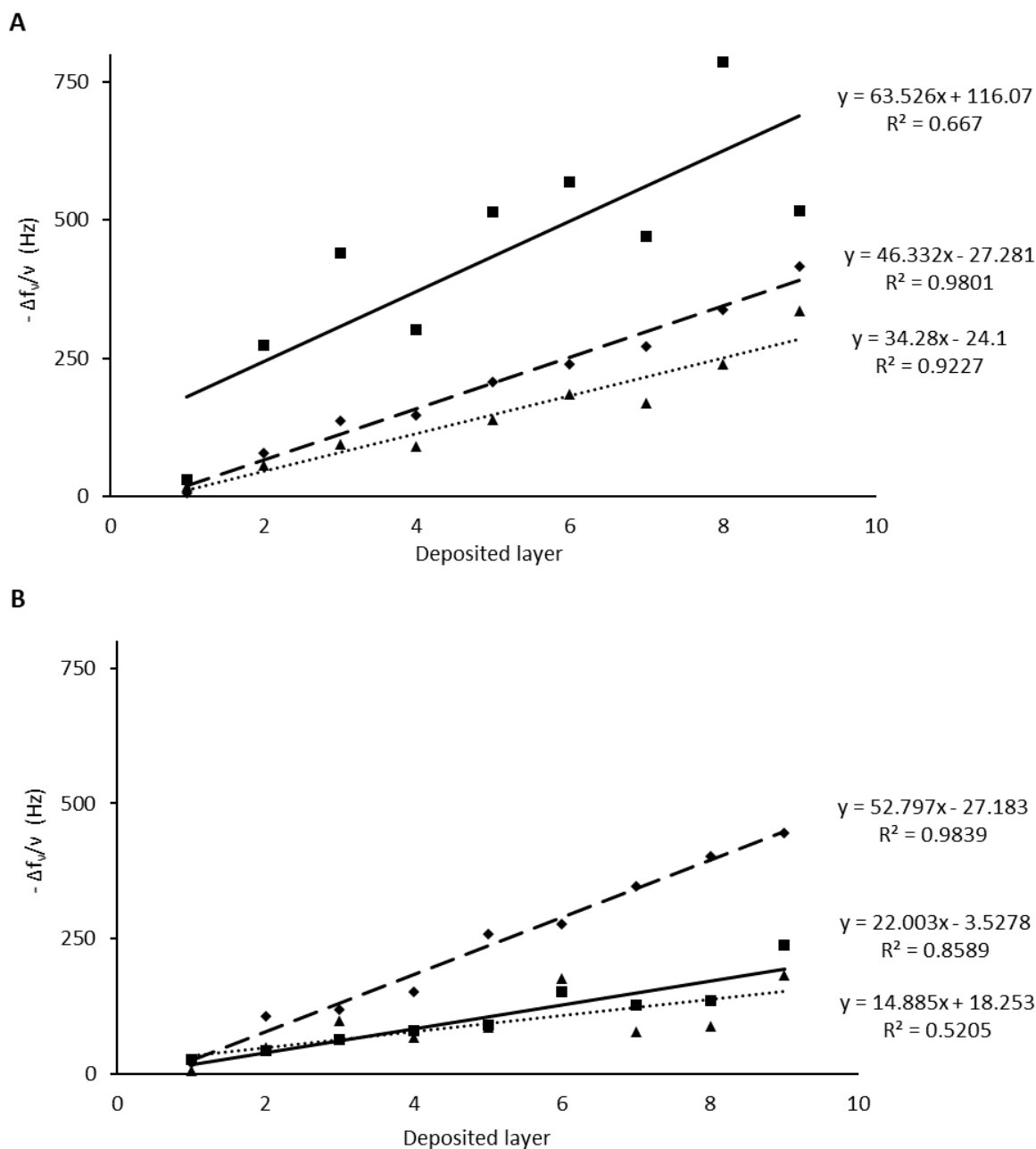


Figure 4: Normalized frequency $-\Delta f_v/v$ (for $v = 3$) as a function of the deposited layer extracted from the QCM monitoring results of the film constructions. (A) PAH-based films. Solid line (\blacksquare), $y = 63.526x + 116.07$ is PAH/PBS-built films, dotted line (\blacktriangle), $y = 34.28x - 24.1$ is PAH/Tris films, and dashed line (\blacklozenge) $y = 46.332x - 27.281$ is PAH/Tris NaCl films. (B) PEI-based films. Solid line (\blacksquare), $y = 22.003x - 3.5278$ is PEI/PBS built films, dotted line (\blacktriangle) = $14.885x + 18.253$ is PEI/Tris films, and dashed line (\blacklozenge) $y = 52.797x - 27.183$ is PEI/Tris NaCl films.

Then, film construction and stability were assessed using CZE. This is an interesting separation tool that can be used to evaluate the global surface charge according to the last deposited layer. (Pallotta et al. 2017) In CZE, the mobility of a neutral compound only depends on the electro-osmotic flow (EOF) derived from the surface charge of the capillary inner wall. EOF was monitored as a function of the last layer deposited inside the capillary wall (Table 4). CZE can also provide interesting information about film stability as the films were exposed to a hydrodynamic flow. The EOF mobility (μ_{EOF}) determined during the first step for bare capillaries corresponds to negatively charged silanoate groups comprising the silica material. When the polycation layer is deposited, a shift in the EOF is observed. These negative mobilities indicate a reversed EOF caused by cationic charges deposited on the inner capillary wall. The difference between μ_{EOF} values shows that PEI deposition induced a more positively charged capillary than PAH deposition, as expected by their chemical groups. Then, the deposited AuNP layer leads to a positive value of EOF as cationic charges are compensated by the addition of negatively charged AuNPs. Finally, the μ_{EOF} of last layer (PAA) deposited increases drastically due to the addition of corresponding anionic charges.

However, as long as stability was questioned, PEI emerged as the worst candidate to build LbL films. Its tendency to collapse or form aggregates inside the capillary after the first cycle of deposition led to the obstruction of capillaries (as observed in 3 independent experiments). Only one complete cycle could eventually be achieved with this technique of deposition (Table 4). In contrast, PAH-built films never clogged the capillary.

Concerning PAH films, the values of μ_{EOF} (Figure 5) are very similar for the PAH/PBS-built film, PAH/Tris buffer-built film and PAH/Tris-NaCl buffer-built film and reproducible from one cycle to another. During construction, no collapse occurred, regardless of the conditions, in contrast to the PEI films. Although no influence of the dissolution buffer is highlighted here, CZE shows that PAH films are at least equivalent in terms of stability.

Finally, PEI-built films showed poor shear stress resistance. Film desorption was explained by the conformation taken by PEI in the presence of phosphate solution or in the absence of counter ions in Tris buffer. On the one hand, the presence of phosphate ions led to their diffusion inside films, where they can strongly interact with several primary amines to destabilize films. In this sense, Gu et al. (Gu et al. 2016) used a QCM to show that LbL films made of PEI/PAA gradually lose mass in the presence of PBS buffer (under physiological concentrations, i.e., 0.15 M). In their study, mass loss was linked to desorption/dissolution of the film. On the other hand, an ion deficit did not provide sufficient counter ions to stabilize all the charges present in the film.

As the final purpose of these films was to apply them on medical devices such as stents or cardiac valves devoted to treat cardiovascular diseases, this coating must meet two essential criteria. The first is to have a sufficient drug reservoir to obtain a therapeutic efficacy, which will depend on the quantity of AuNPs in the film. The second criterion is to achieve a stable system, resistant to shear stress. Finally, among all the studied conditions, only PAH used alongside Tris-NaCl buffer appears to fulfil these two criteria, making this combination a promising system to be developed in our targeted applications. Further work is currently developed in our lab on the grafting of a drug on AuNP to bring biological proofs of interest (interactions with vascular cells, with immune system and impact on coagulation cascade). In this paper, we wanted to emphasize on the building of such films to help the scientific community to make the relevant choices in terms of polymers and, buffer and/or to have a simple analytical methodology to screen multiple conditions.

Table 4: Evolution of the electroosmotic flow mobility (μ_{EOF}) in accordance with the last layer deposited inside the capillary ($n = 3$). N.D.: Not determined values for unstable films (clogged capillary)

		$\mu_{\text{EOF}} (10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V/s})$					
Nude capillary		52.8 ± 1.5					
Buffer		PBS		Tris		Tris-NaCl	
Deposited layer		PAH	PEI	PAH	PEI	PAH	PEI
Cycle 1	Polycation	-3.5 ± 0.6	-27.4 ± 1.6	-7.5 ± 2.7	-23.2 ± 0.1	-25.5 ± 4.5	-24.5 ± 13.5
	AuNP	2.0 ± 1.4	34.4 ± 3.2	9.6 ± 1.2	11.4 ± 10.1	24.0 ± 1.3	32.1 ± 2.3
	PAA	43.0 ± 0.4	36.5 ± 0.4	31.1 ± 5.6	-4.04 ± 7.0	50.8 ± 8.7	48.0 ± 4.4
Cycle 2	Polycation	-23.1 ± 1.2	-22.6 ± 0.6	-20.1 ± 2.3	N.D.	-23.1 ± 11.4	N.D.
	AuNP	27.0 ± 0.8	29.4 ± 0.9	11.8 ± 0.8	N.D.	22.4 ± 8.7	N.D.
	PAA	40.8 ± 0.4	N.D.	36.4 ± 1.4	N.D.	44.2 ± 19.1	N.D.
Cycle 3	Polycation	-24.0 ± 0.8	N.D.	-17.8 ± 4.0	N.D.	-35.8 ± 21.2	N.D.
	AuNP	28.0 ± 0.4	N.D.	28.0 ± 0.2	N.D.	7.7 ± 26.0	N.D.
	PAA	42.5 ± 1.7	N.D.	38.5 ± 1.0	N.D.	49.2 ± 11.3	N.D.

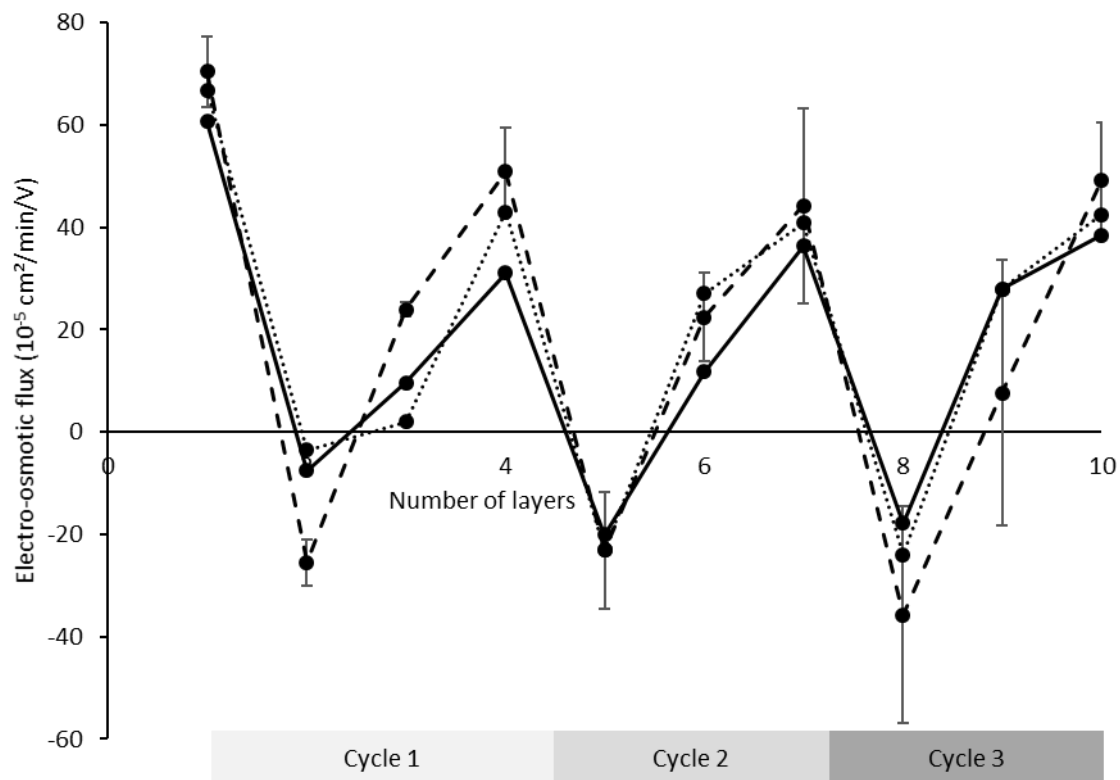


Figure 5: Evolution of the electroosmotic flow mobility (μ_{EOF}) in accordance with the last layer deposited inside the capillary ($n = 3$). Only fully built films are represented (*i.e.*, PAH-based films). The solid line is PAH/PBS-built films, the dotted line is PAH/Tris films, and the dashed line is PAH/Tris NaCl films.

4. Conclusion

The present strategy demonstrated different analytical approaches to investigate the importance of key parameters for the construction of nanostructured LbL films. Spectrophotometry was found to be useful for rapid and nondestructive monitoring of a nanostructured film during the construction process. HPLC, a destructive assay, allowed the quantitative determination of the number of particles per unit area. The film stability was studied through two different techniques. QCM evaluated the adsorption and/or desorption of each layer comprising the film in real-time. CZE provided important information on the surface charge evolution of the film during construction and on its stability when exposed to shear stress. The combination of these different methodologies showed, to the best of our knowledge, a real novelty to obtain insight into the analysis of LbL construction. Thanks to this analytical strategy, we determined that the structure of the polycation was important to obtain stable films with high incorporation rates of AuNPs. It appeared that PAH was the best compromise in terms of both AuNP inclusion and film stability. The nature of the buffer also played an important role, as phosphate ions (in PBS) were demonstrated to negatively impact film formation. In contrast, Tris-NaCl buffer has been shown to be a better medium to build an appropriate drug reservoir for future biomedical applications.

Acknowledgements

The authors would like to thank Aurélien Renaudin and Valentin Philippe from Université de Lorraine for their help with CZE and HPLC and Bernard Senger from INSERM U1121 for his help with the interpretation of the QCM data. The authors also acknowledge “Region Grand Est” for financial support.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- Acharya, Gayathri, Chi H. Lee, and Yugyung Lee. 2012. "Optimization of Cardiovascular Stent against Restenosis: Factorial Design-Based Statistical Analysis of Polymer Coating Conditions" edited by C. Moretti. *PLoS ONE* 7(8):e43100. doi: 10.1371/journal.pone.0043100.
- Beurton, J., I. Clarot, J. Stein, B. Creusot, C. Marcic, E. Marchioni, and A. Boudier. 2019. "Long-Lasting and Controlled Antioxidant Property of Immobilized Gold Nanoparticles for Intelligent Packaging." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 176:439–48. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.01.030.
- Costa, Rui R., and João F. Mano. 2014. "Polyelectrolyte Multilayered Assemblies in Biomedical Technologies." *Chemical Society Reviews* 43(10):3453. doi: 10.1039/c3cs60393h.
- Decher, G. 1997. "Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites." *Science* 277(5330):1232–37. doi: 10.1126/science.277.5330.1232.
- Deligöz, Hüseyin, and Bernd Tieke. 2014. "QCM-D Study of Layer-by-Layer Assembly of Polyelectrolyte Blend Films and Their Drug Loading-Release Behavior." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 441:725–36. doi: 10.1016/j.colsurfa.2013.10.033.
- Diamanti, E., P. Andreozzi, R. Anguiano, L. Yate, D. Gregurec, N. Politakos, R. F. Ziolo, E. Donath, and S. E. Moya. 2016. "The Effect of Top-Layer Chemistry on the Formation of Supported Lipid Bilayers on Polyelectrolyte Multilayers: Primary versus Quaternary Amines." *Physical Chemistry Chemical Physics* 18(47):32396–405. doi: 10.1039/C6CP06258J.
- Diamanti, Eleftheria, Patrizia Andreozzi, Christopher Kirby, Ramiro Anguiano, Luis Yate, Hendrik Heinz, Ronald F. Ziolo, Edwin Donath, and Sergio Enrique Moya. 2017. "Study of the Impact of Polyanions on the Formation of Lipid Bilayers on Top of Polyelectrolyte Multilayers with Poly(Allylamine Hydrochloride) as the Top Layer." *The Journal of Physical Chemistry B* 121(5):1158–67. doi: 10.1021/acs.jpcc.6b12237.
- Garza, Juan Méndez, Pierre Schaaf, Sylvaine Muller, Vincent Ball, Jean-François Stoltz, Jean-Claude Voegel, and Philippe Lavalle. 2004. "Multicompartment Films Made of Alternate Polyelectrolyte Multilayers of Exponential and Linear Growth." *Langmuir* 20(17):7298–7302. doi: 10.1021/la049106o.
- Gu, Yuanqing, Emily K. Weinheimer, Xiang Ji, Clinton G. Wiener, and Nicole S. Zacharia. 2016. "Response of Swelling Behavior of Weak Branched Poly(Ethylene Imine)/Poly(Acrylic Acid) Polyelectrolyte Multilayers to Thermal Treatment." *Langmuir* 32(24):6020–27. doi: 10.1021/acs.langmuir.6b00206.
- Kim, Byeong-Su, Renée C. Smith, Zhiyong Poon, and Paula T. Hammond. 2009. "MAD (Multiagent Delivery) Nanolayer: Delivering Multiple Therapeutics from Hierarchically Assembled Surface Coatings[†]." *Langmuir* 25(24):14086–92. doi: 10.1021/la9017618.
- Kim, Chang-Yeoul, Lixing Xu, Eun-Hee Lee, and Yong-Ho Choa. 2013. "Magnetic Silicone Composites with Uniform Nanoparticle Dispersion as a Biomedical Stent Coating for Hyperthermia." *Advances in Polymer Technology* 32(S1):E714–23. doi: 10.1002/adv.21314.

- Kim, Kwan, Hyunwoo Ryoo, Yoon Mi Lee, and Kuan Soo Shin. 2010. "Adsorption Characteristics of Au Nanoparticles onto Poly(4-Vinylpyridine) Surface Revealed by QCM, AFM, UV/Vis, and Raman Scattering Spectroscopy." *Journal of Colloid and Interface Science* 342(2):479–84. doi: 10.1016/j.jcis.2009.10.019.
- Li, Wen-Tao, Min-Hua Wang, Yong-Jun Li, Yue Sun, and Jian-Chun Li. 2011. "Linker-Free Layer-by-Layer Self-Assembly of Gold Nanoparticle Multilayer Films for Direct Electron Transfer of Horseradish Peroxidase and H₂O₂ Detection." *Electrochimica Acta* 56(20):6919–24. doi: 10.1016/j.electacta.2011.06.023.
- Liu, Shen, Shenghe Liu, Xudong Liu, Jingwen Zhao, Wenguo Cui, and Cunyi Fan. 2013. "Antibacterial Antiadhesion Membranes from Silver-Nanoparticle-Doped Electrospun Poly(L-Lactide) Nanofibers." *Journal of Applied Polymer Science* 129(6):3459–65. doi: 10.1002/app.39099.
- Liu, Yangshuo, Wenbao Chen, and Hyung-II Kim. 2012. "Antibacterial Activity of PH-Sensitive Genipin Cross-Linked Chitosan/Poly(Ethylene Glycol)/Silver Nanocomposites." *Polymers for Advanced Technologies* 23(1):8–14. doi: 10.1002/pat.1818.
- Mertz, Damien, Cédric Vogt, Joseph Hemmerlé, Christian Debry, Jean-Claude Voegel, Pierre Schaaf, and Philippe Lavalle. 2011. "Tailored Design of Mechanically Sensitive Biocatalytic Assemblies Based on Polyelectrolyte Multilayers." *Journal of Materials Chemistry* 21(23):8324. doi: 10.1039/c0jm03496g.
- Pallotta, Arnaud, Ariane Boudier, Pierre Leroy, and Igor Clarot. 2016. "Characterization and Stability of Gold Nanoparticles Depending on Their Surface Chemistry: Contribution of Capillary Zone Electrophoresis to a Quality Control." *Journal of Chromatography A* 1461:179–84. doi: 10.1016/j.chroma.2016.07.031.
- Pallotta, Arnaud, Igor Clarot, Jonathan Sobocinski, Elias Fattal, and Ariane Boudier. 2019. "Nanotechnologies for Medical Devices: Potentialities and Risks." *ACS Applied Bio Materials* 2(1):1–13. doi: 10.1021/acsabm.8b00612.
- Pallotta, Arnaud, Marianne Parent, Igor Clarot, Ming Luo, Vincent Borr, Pan Dan, Véronique Decot, Patrick Menu, Ramia Safar, Olivier Joubert, Pierre Leroy, and Ariane Boudier. 2017. "Blood Compatibility of Multilayered Polyelectrolyte Films Containing Immobilized Gold Nanoparticles." *Particle & Particle Systems Characterization* 34(1):1600184. doi: 10.1002/ppsc.201600184.
- Pallotta, Arnaud, Valentin Philippe, Ariane Boudier, Pierre Leroy, and Igor Clarot. 2018. "Highly Sensitive and Simple Liquid Chromatography Assay with Ion-Pairing Extraction and Visible Detection for Quantification of Gold from Nanoparticles." *Talanta* 179:307–11. doi: 10.1016/j.talanta.2017.11.016.
- Pavlukhina, Svetlana, and Svetlana Sukhishvili. 2011. "Polymer Assemblies for Controlled Delivery of Bioactive Molecules from Surfaces." *Advanced Drug Delivery Reviews* 63(9):822–36. doi: 10.1016/j.addr.2011.03.017.
- Suh, J., H. J. Paik, and B. K. Hwang. 1994. "Ionization of Poly(Ethylenimine) and Poly(Allylamine) at Various PH's." *Bioorganic Chemistry* 22(3):318–27. doi: 10.1006/bioo.1994.1025.
- Tian, Shengjun, Jianyun Liu, Tao Zhu, and Wolfgang Knoll. 2004. "Polyaniline/Gold Nanoparticle Multilayer Films: Assembly, Properties, and Biological Applications." *Chemistry of Materials* 16(21):4103–8. doi: 10.1021/cm049211j.

- Tournebize, Juliana, Ariane Boudier, Anne Sapin-Minet, Philippe Maincent, Pierre Leroy, and Raphaël Schneider. 2012. "Role of Gold Nanoparticles Capping Density on Stability and Surface Reactivity to Design Drug Delivery Platforms." *ACS Applied Materials & Interfaces* 4(11):5790–99. doi: 10.1021/am3012752.
- Wang, Yifeng, Xuecheng Guo, Ruihao Pan, Di Han, Tao Chen, Zenghua Geng, Yanfei Xiong, and Yanjun Chen. 2015. "Electrodeposition of Chitosan/Gelatin/Nanosilver: A New Method for Constructing Biopolymer/Nanoparticle Composite Films with Conductivity and Antibacterial Activity." *Materials Science and Engineering: C* 53:222–28. doi: 10.1016/j.msec.2015.04.031.
- Yoshida, Kentaro, Katsuhiko Sato, Tetsuya Ono, Takenori Dairaku, and Yoshitomo Kashiwagi. 2018. "Preparation of Nafion/Polycation Layer-by-Layer Films for Adsorption and Release of Insulin." *Polymers* 10(8):812. doi: 10.3390/polym10080812.

Conclusions de l'article 2 :

Au travers de ce second article, nous avons développé une stratégie analytique permettant de caractériser finement la construction de films multicouches intégrant des AuNP. L'ensemble des méthodes mises en œuvre a permis de déterminer que l'utilisation du polycation PAH (polyallylamine) en combinaison avec le tampon Tris-NaCl (0,01 – 0,15 M ; pH = 7,4) offrait le meilleur compromis en termes de quantité d'AuNP immobilisées et de stabilité du revêtement. Les AuNP stabilisées par des ions citrate utilisées ici sont des objets pour lesquelles la chimie de surface est relativement simple. A ce stade, elles ne portent pas encore de principe actif, elles ont servi de modèle d'étude. Maintenant que les conditions optimales de création du réservoir ont été déterminées, il est nécessaire de s'intéresser au moyen d'y ajouter le principe actif.

2.2. Fonctionnalisation par NO

La création d'une surface libérant du NO peut être atteinte selon deux méthodes décrites dans la revue du chapitre 1. La première consiste en l'ajout de fonctions NONOates au sein des films. Bien que chimiquement envisageable, cette méthode impose la création d'un revêtement hydrophobe car cette fonction présente une cinétique de libération de NO très rapide (forte sensibilité à l'hydrolyse) imposant donc une restriction du design des surfaces. De plus, elle peut conduire à la formation de sous-produits toxiques (nitrosamines). La seconde stratégie, plus appropriée dans le cadre de notre application finale, repose sur l'ajout de fonctions SNO. Cette méthode permet le greffage de NO sur une surface en mimant la forme de stockage physiologique de NO⁶², limitant ainsi les risques de tolérance et de toxicité. Pour présenter une efficacité thérapeutique capable de limiter le phénomène de resténose observé après l'implantation d'un stent, la surface développée doit fournir une libération continue de NO durant 6 semaines selon un flux de 0.1 nmol.cm⁻².min⁻¹ ce qui correspond donc à une charge totale en NO de l'ordre 6 μmol.cm⁻²⁵. Des travaux précédents sur des AuNP colloïdales potentiellement nitrosables ont permis de greffer 10³ thiols (GSH) par nanoparticule (AuNP@DHLA-GSH)⁹ (Figure 6). Cette synthèse s'opère en deux temps : 1) introduction d'un ligand (acide α-dihydrolipoïque, DHLA) sur la nanoparticule (AuNP@DHLA) pour « pacifier » sa surface vis-à-vis de son avidité à capter des fonctions thiols puis ajouter une fonction permettant un greffage de la molécule d'intérêt *i.e.* glutathion 2) greffage du glutathion.

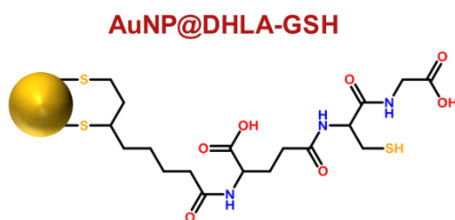


Figure 6 : Représentation schématique des AuNP@DHLA-GSH

Dans ce travail de fonctionnalisation d'une surface, la stratégie développée (Figure 7) est basée sur un mécanisme en deux étapes. Dans un premier temps, les AuNP colloïdales sont fonctionnalisées par l'addition d'un thiol réduit (-SH). Puis dans un second temps, les AuNP sont immobilisées au sein des films multicouches puis nitrosées pour former une fonction S-nitrosothiol (-SNO). Cependant, l'étude présentée ci-après reste très exploratoire compte tenu des résultats qui ne sont pas complètement à la hauteur de ceux escomptés.

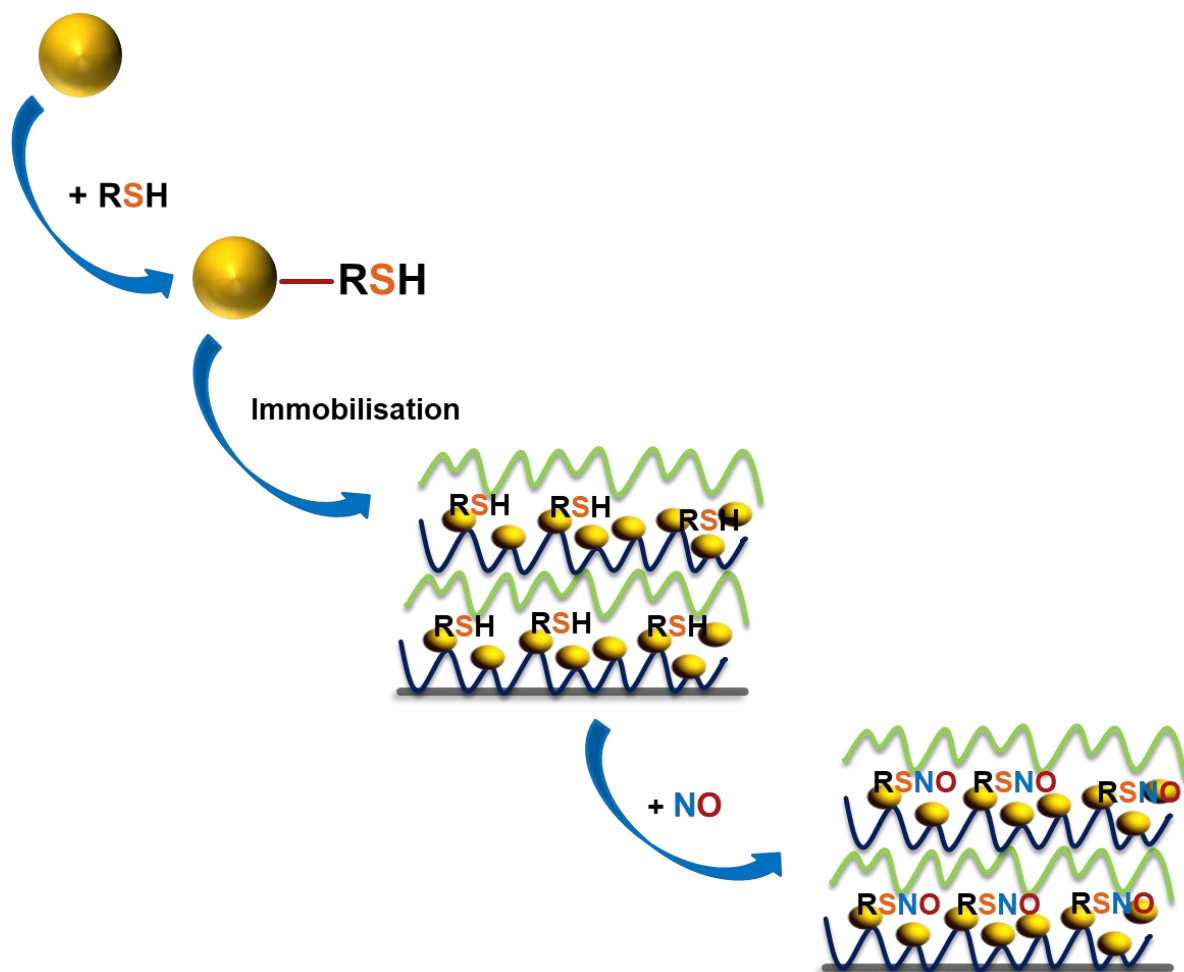


Figure 7 : Stratégie de fonctionnalisation des AuNP avant immobilisation. Un thiol est lié en surface d'une particule non fonctionnalisée pour former une espèce de type AuNP-RSH. Puis, ces particules sont nitrosées après immobilisation dans le film multicouche.

2.2.1 Fonctionnalisation des nanoparticules avant leur immobilisation

La première stratégie de fonctionnalisation envisagée repose sur la fonctionnalisation des AuNP puis leur inclusion au sein des films multicouches. Dans ce but, plusieurs types d'objets ont été créés. Les premiers essais ont été réalisés à partir des AuNP fonctionnalisées par le GSH.

Les AuNP@DHLA-GSH dont le processus de synthèse, précédemment mis au point au laboratoire ⁹ est détaillé par la figure 8 sont obtenues en deux temps à partir des AuNP stabilisées par des ions citrate.

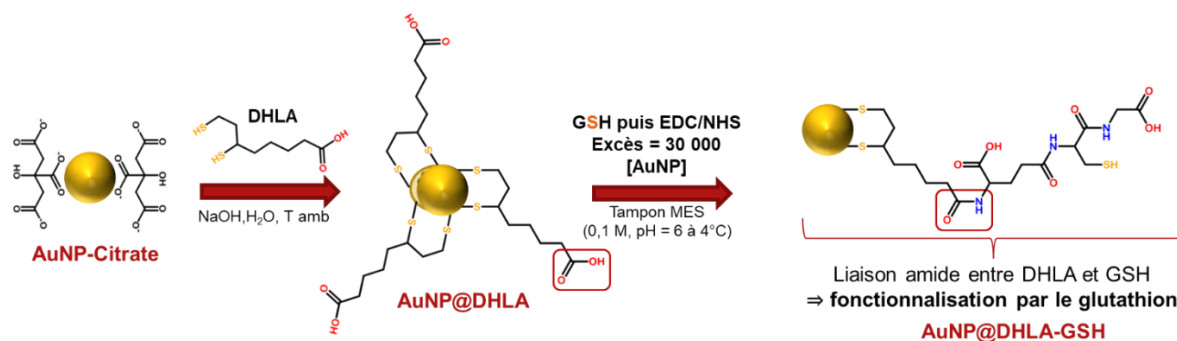


Figure 8 : Processus de synthèse en deux temps des AuNP@DHLA-GSH à partir des AuNP-citrate 3. La première réaction sur les AuNP-citrate est réalisée en condition basique (NaOH 0,5 M) avec un excès de concentration en DHLA (60 mM) correspondant à 10^6 fois la concentration en AuNP-citrate (60 nM). La seconde réaction de couplage avec GSH est réalisée avec les réactifs de couplage (1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et N-hydroxysuccinimide (NHS)) à 30 000 fois la concentration en AuNP@DHLA soit 1,5 mM dans le tampon MES (Acide 2-morpholin-4-yléthanesulfonique), identifié comme étant le milieu le plus favorable à cette réaction (pH inférieur à 7 et absence de fonction amine ou carboxylique)⁶³

Dans un premier temps, par échange de ligand, les ions citrate assurant la stabilisation des AuNP sont remplacés par un ligand de forte affinité (DHLA) interagissant par une fonction thiols via une liaison (Au-S) quasi-covalente ⁶⁴. Cette étape permet la création d'objets fortement stabilisés servant de plateforme fonctionnalisable. Puis dans un second temps, la création d'une liaison amide entre les fonctions acide carboxylique des AuNP et amine du GSH permet le couplage du principe actif nitrosable. L'évolution des paramètres physico-chimiques des AuNP, présentés dans le tableau 1, au cours de la synthèse témoigne de la modification de

la surface des particules. En effet, on observe une augmentation du diamètre hydrodynamique des nanoparticules au fur et à mesure de l'ajout de ligands à leur surface. L'augmentation de la longueur de la bande de résonance plasmonique des AuNP est aussi le reflet de la variation de la taille et de la chimie de surface des particules. Enfin, la quantification des thiols présent en surface des nanoparticules fonctionnalisées AuNP@DHLA-GSH par la méthode d'Ellman a révélé une quantité de 2000 ± 250 GSH par nanoparticule soit une concentration de 105 ± 13 μM de thiols. Ces résultats sont conformes à ceux précédemment obtenus au laboratoire.⁹

Tableau 1 : Evolution des caractéristiques physico-chimiques (n=3) des AuNP au cours de leur fonctionnalisation par les ligands DHLA et GSH

Paramètre physico-chimique (Technique)	AuNP- Citrate	AuNP@ DHLA	AuNP@ DHLA-GSH
λ max (nm) (Spectro UV-Vis)	$514 \pm 1,0$	$521 \pm 2,0$	$535 \pm 0,3$
Diamètre hydrodynamique Dh (nm) (Dynamic Light Scattering (DLS ^o))	$5,8 \pm 0,9$	$8,4 \pm 0,9$	$34,3 \pm 0,6$
Potentiel Zêta ζ (mV) (Electrophorèse couplée DLS)	$-32 \pm 1,0$	$-46 \pm 3,0$	$-31,0 \pm 2,0$
Concentration en thiols (μM) (Quantification selon la réaction d'Ellman ¹⁰)	/	/	105 ± 13

Un potentiel Zêta de $-31,0 \pm 2,0$ mV a été déterminé pour les AuNP@DHLA-GSH, ces particules chargées négativement devraient donc pouvoir être immobilisées au sein des films multicouches *via* des interactions électrostatiques avec une couche de polycation PAH. Lors de l'immobilisation d'AuNP, le suivi du spectre d'absorbance des films dans le domaine du visible

(400 -800 nm) doit révéler un maximum d'absorbance d'une longueur d'onde proche de celle de la bande plasmon des AuNP (cf article 2). Tout d'abord, l'immobilisation des AuNP@DHLA-GSH au sein des films multicouches a été étudiée selon la construction classique en trois cycles [PAH-AuNP-PAA]₃ déjà décrite. Le suivi de la variation d'absorbance de ces films pendant leur construction a révélé une absorbance au λ max égal à 0,10 pour un film multicouches formé par 3 cycles (PAH-AuNP@DHLA-GSH)₃ soit une absorbance 4 fois inférieure à celle mesurée sur des films équivalents immobilisant des AuNP-citrate (Figure 10).

Une condition d'immobilisation alternative a été essayée dans le but de maximiser la quantité d'AuNP immobilisées. Des travaux précédents ont montré qu'à partir d'un dépôt d'une monocouche de PAH, il est possible de réaliser plusieurs cycles de dépôt d'AuNP-citrate et d'augmenter la densité d'AuNP immobilisées (cf article 4 en annexe). Un film constitué avec 15 dépôts successifs d'AuNP nommé [PAH-AuNP@DHLA-GSH₁₅] (Figure 9) a été créé. Ce film présentait une absorbance au λ max égal à 0,25. A titre de comparaison l'absorbance d'un film formé de la même façon avec des AuNP-citrate est égale à 1,0 (Figure 10).

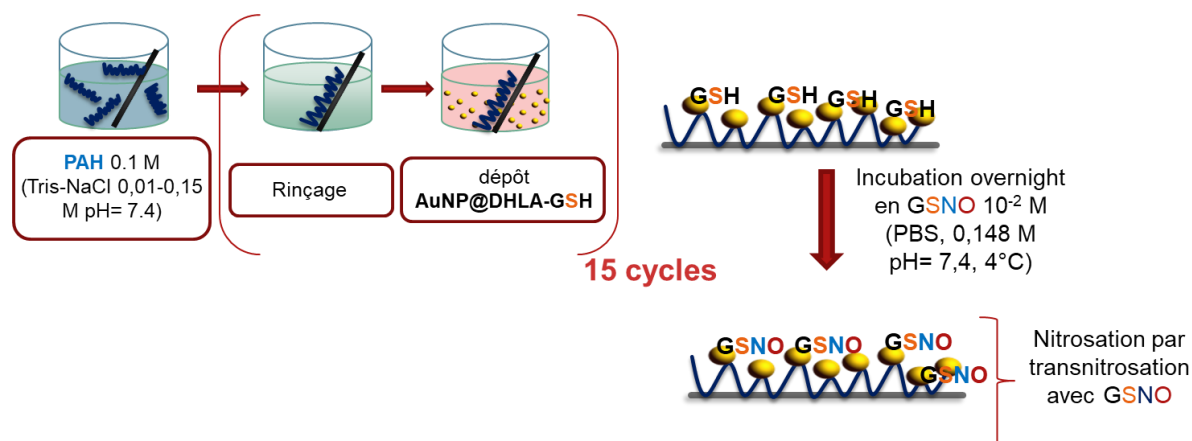


Figure 9 : Dépôts successifs des AuNP@DHLA-GSH (15 cycles) sur une monocouche de polycation PAH suivi par la nitrosation de la surface par incubation overnight dans une solution de GSNO (10⁻²M).

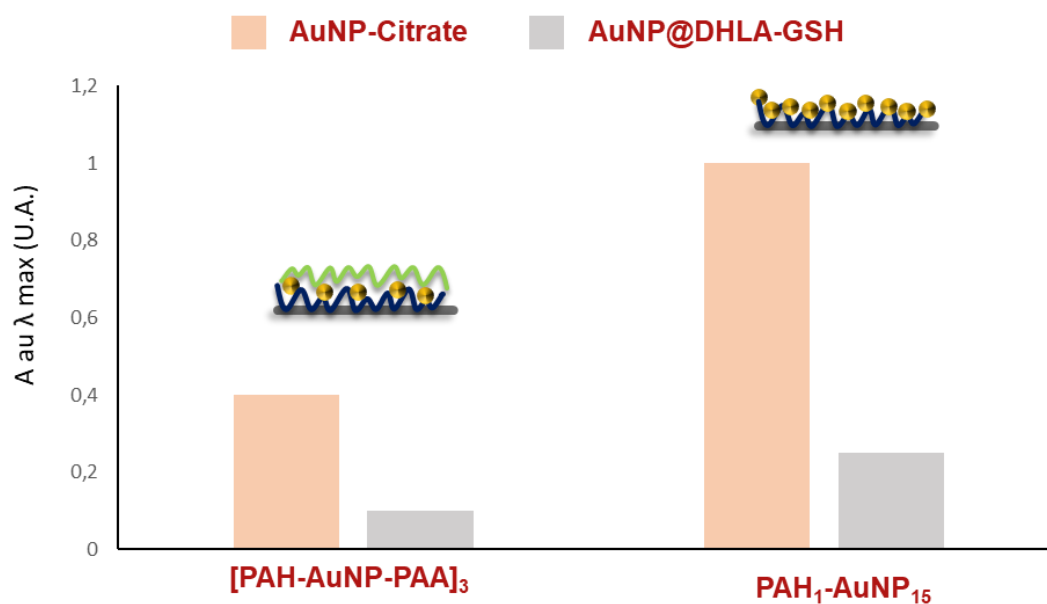


Figure 10 : Absorbance ($n=1$) au λ max de films [PAH-AuNP-PAA]₃ et PAH₁-AuNP₁₅ immobilisant des AuNP-citrate (orange) et des AuNP@DHLA-GSH (gris). L'absorbance des films immobilisant des AuNP est proportionnelle à la quantité d'AuNP immobilisées (cf stratégie analytique développée dans l'article 2).

La quantification des thiols présents au sein des films PAH-AuNP@DHLA-GSH₁₅ par la méthode d'Ellman a permis de déterminer une quantité ($n=3$) de $0,78 \pm 0,08$ nmol/cm². Cette valeur est inférieure à la cible établie dans le cahier des charges (*i.e.* 6 μ mol/cm²). La nitrosation de cette surface par transnitrosation (Figure 9), réaction qui consiste à transférer le NO d'une espèce S nitrosothiols (RSNO) vers un thiol réduit (RSH), a fourni une quantité de NO ($n=3$) sur le film de $0,66 \pm 0,05$ nmol/cm² soit un rendement de réaction de 85 %.

Dans le but d'atteindre une plus grande quantité de fonctions nitrosables (thiols réduits), une seconde stratégie de fonctionnalisation des AuNP avant leur inclusion dans le film a été envisagée. Elle reposait sur la synthèse d'AuNP portant des amines primaires à leur surface. L'objectif était de pouvoir faire réagir ces objets avec le réactif de Traut selon le schéma réactionnel de la figure 11. Ce réactif réagit avec une amine primaire en y liant une courte chaîne carbonée se terminant par un groupement thiol réduit (-SH) (Figure 11) sur lequel peut être lié le NO pour former une fonction SNO.

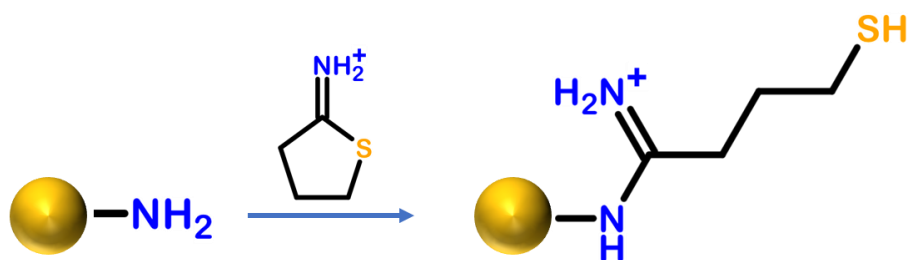


Figure 11 : Fonctionnalisation d'AuNP portant des fonctions amines primaires par le réactif de Traut.

Deux types d'objets arborant des amines primaires en surface ont été synthétisés dans le but de les fonctionnaliser par le réactif de Traut (Figure 12 et Tableau 2). Sur les AuNP stabilisées par un polymère aminé (AuNP-PAH) une partie des fonctions amines de ce polycation assure la stabilisation du cœur d'or par une interaction de faible énergie. Les fonctions amines libres n'interagissant pas avec le cœur d'or confèrent leur charge positive aux AuNP (Potentiel Zêta = $31,0 \pm 3,0$ mV) et sont accessibles à la fonctionnalisation par le réactif de Traut. L'autre stratégie de synthèse développée repose sur une interaction quasi-covalente (Au-S) entre les AuNP et la fonction thiol d'une cystéamine (AuNP@Cystéamine), ceci permet de limiter les risques de désorption du ligand de surface et par voie de conséquence de favoriser la stabilité de ces objets.

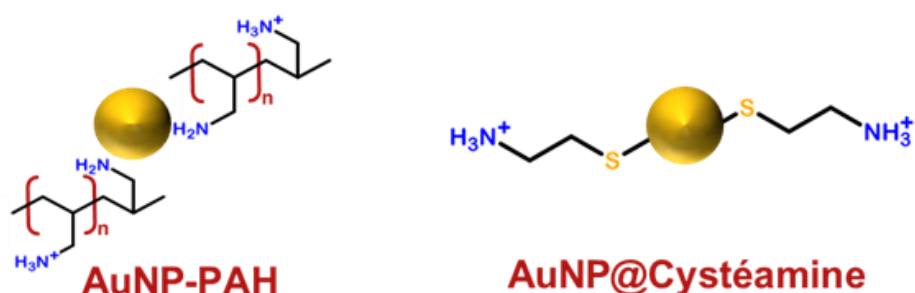


Figure 12 : AuNP-PAH et AuNP@Cystéamine portant des amines primaires pouvant être fonctionnalisées par le réactif de Traut. Les protocoles de synthèse de ces AuNP et leur caractérisation physico-chimique sont détaillés ci-après dans l'article 3 du chapitre 3.

Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques ($n=3$) des AuNP portant des fonctions amines primaires (AuNP-PAH et AuNP @Cystéamine).

Paramètre physico-chimique (Technique)	AuNP- PAH	AuNP@ Cystéamine
λ max (nm) (Spectro UV-Vis)	528 ± 2	522 ± 3
Diamètre hydrodynamique Dh (nm) (Dynamic Light Scattering (DLS°))	$11,9 \pm 0,7$	$10,5 \pm 1,5$
Potentiel Zêta ζ (mV) (Electrophorèse couplée DLS)	$31,0 \pm 3,0$	$28,0 \pm 2,0$

La fonctionnalisation des AuNP-PAH par le réactif de Traut a permis de former 45 μ M de thiols réduits en surface des AuNP (AuNP-PAH-SH, Figure 13). A l'inverse, quelles que soient les concentrations en réactifs de Traut utilisées lors de la fonctionnalisation des AuNP@Cystéamine une précipitation de ces objets a été observée. Ce constat était probablement dû à l'agrégation *via* la formation de liaisons S-S entre les particules. A l'inverse le PAH offre un encombrement stérique en surface des AuNP qui limite la formation de ponts disulfure ce qui permet d'expliquer la stabilité de ces objets.

AuNP-PAH-SH

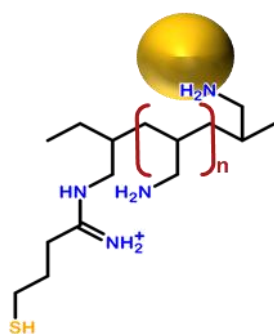


Figure 13 : AuNP-PAH-SH obtenues par la fonctionnalisation des AuNP-PAH avec le réactif de Traut.

L'immobilisation des AuNP-PAH-SH (Figure 13) chargées positivement dans les films a été testée sur différents types de surfaces chargées négativement. Dans un premier temps sur des films PAH-PAA et PAH-PAA₃. Puis dans un second temps, l'utilisation d'un polyanion fort le poly(styrène sulfonate) (PSS), dont l'ionisation des fonctions n'est pas dépendante du pH, a aussi été testée car ce polyanion a déjà démontré sa capacité à immobiliser les particules positives AuNP-CTAB (Bromure de BénylTriméthylAmmonium)⁶⁵. Cependant, aucune de ces conditions n'a permis l'immobilisation des AuNP-PAH-SH.

La stratégie de fonctionnalisation développée dans cette partie reposait sur la fonctionnalisation d'AuNP par une fonction thiol réduite puis leur inclusion au sein des films multicouches. Dans ce but, 3 types d'objets (AuNP@DHLLA-GSH, AuNP-PAH-SH, AuNP@Cystéamine) ont été synthétisés (Tableau 3).

Tableau 3 : Bilan de la stratégie de fonctionnalisation des nanoparticules par un thiol réduit avant leur immobilisation au sein des films.

Type d'AuNP	AuNP@DHLA-GSH	AuNP-PAH-SH	AuNP@Cystéamine
Concentration en thiol à l'état colloïdale (μM)	105	45	AuNP instable (agrégation) lors de la fonctionnalisation par le réactif de Traut
Immobilisation	Immobilisable en faible quantité	AuNP non immobilisable	Non applicable
Quantité de thiols après immobilisation ($\text{nmol SH} / \text{cm}^2$)	$0,78 \pm 0,08$	Non applicable	Non applicable
Quantité de NO après immobilisation ($\text{nmol NO} / \text{cm}^2$)	$0,66 \pm 0,05$	Non applicable	Non applicable

Seules les AuNP@DHLA-GSH ont permis de mener la stratégie de fonctionnalisation à son terme en créant une surface avec une quantité de NO de $0,66 \text{ nmol} / \text{cm}^2$.

2.2.2 Conclusions et perspectives

L'ajout de fonctions *S*-nitrosothiols (SNO) au sein des films multicouches a été identifié comme étant le principal verrou scientifique de ce projet. En dépit des stratégies de fonctionnalisation des AuNP étudiées, la densité de NO contenue au sein des films n'a jamais dépassé l'ordre du nmole de NO / cm² alors que dans le contexte physiopathologique de ce projet une activité thérapeutique long terme impose une densité de l'ordre du μmole /cm².

Au delà de cette quantité, la cinétique de libération de NO par les surfaces décrites dans cette partie reste un point clé à étudier. Un effet biologique consécutif à une libération de NO est observable à partir d'un flux de NO de 0,05 nmol/cm²/min (flux basal de synthèse en NO d'un endothélium sain ⁶⁶). Cependant cette quantification a de très faible taux en NO n'est pour l'instant pas envisageable par les méthodes dont nous disposons au laboratoire. En effet l'étude de la cinétique de libération du NO requerrait une méthode de quantification possédant une limite de quantification (LOQ) inférieure au nM. Actuellement, la quantification de NO et/ou d'ions nitrite ou nitrate (issus de l'oxydation de NO) est effectuée par spectro- photo/fluorimétrie après réaction avec une sonde chromogène ⁶⁷ (méthode de Griess ⁶⁸, LOQ = 3 μM) ou fluorogène (méthode de DAN ⁶⁹, LOQ = 0,1 μM) ou par électrochimie ⁷⁰ (électrode à NO, LOQ = 250 nM).

La revue de la littérature présentée dans le chapitre 1 fait état des différentes stratégies permettant de créer des surfaces fonctionnalisées par le NO. Le design de surface liant de façon covalente la fonction *S*-nitrosothiol comme source de NO y est le moins décrit, probablement à cause de la forte labilité de cette structure et reste un facteur limitant pour de nombreux chercheurs. Parmi ces quelques travaux publiés, l'étude de Simon-Walker *et al*, présente un film multicouche intégrant une quantité de NO similaire à celle rencontrée ici (0,8 nmol/cm²) libéré selon un flux de 0,04 nmol/cm² (soit 20 min de libération) ⁵⁴. Il a été rapporté que cette

surface permettait *via* la libération de NO de réduire l'adhésion plaquettaire et leucocytaire, suggérant qu'une activité biologique reste observable même avec une libération de courte durée. Ainsi, il est tout de même envisagé d'étudier l'effet apporté par les différentes surfaces présentées ici vis-à-vis de l'adhésion plaquettaire ou de la prolifération des cellules endothéliales par exemple. Cette première approche représenterait *a minima* une preuve de concept démontrant un effet biologique apporté par nos surfaces libérant du NO. Ceci sera abordé dans la dernière partie de ce document.

Enfin, la création d'une surface catalytique capable d'une génération *in situ* de NO, telle que décrit dans la revue (article 1), pourrait représenter une alternative capable d'atteindre un effet thérapeutique. En s'appuyant sur les savoir-faire et d'autres projets en cours au sein du laboratoire, deux solutions permettant de conférer aux films une activité catalytique vis-à-vis des RSNO pourraient être considérées. La première s'appuierait sur la fonctionnalisation des films par des composés séléniés (RSe)⁷¹. Par exemple, une méthodologie de fonctionnalisation d'un polycation aminé par le sélénium a déjà été décrite dans la littérature⁷². Cependant cette stratégie risquerait de se heurter aux mêmes contraintes de rendement de greffage que celles décrites au travers de cette partie. La seconde solution serait l'immobilisation de nanoparticules bimétalliques cœur-couronne composée d'or et de cuivre, dont la synthèse a déjà fait l'objet d'études préliminaires au sein du laboratoire. Cette stratégie permettrait de combiner la stabilité d'un cœur d'or et l'activité catalytique dénitrosante portée par une couronne de cuivre. D'autant qu'à travers les travaux présentés ici, nous avons développé une solide expertise concernant la caractérisation et l'immobilisation des nanoparticules métalliques.

Chapitre 3 : Biocompatibilité des AuNP et des films multicouches immobilisant des AuNP

3.1 Etude de l'hémocompatibilité d'un panel de nanoparticules d'or selon leur ligand de surface.

Les stratégies de fonctionnalisation des AuNP, développées dans le chapitre précédent, ont permis la création d'un panel de nanoparticules présentant une grande variété de caractéristiques physico-chimiques. Les AuNP sont constituées par un cœur d'or de degré d'oxydation 0 stabilisé par un ligand en interaction avec celui-ci. C'est cette couche externe de stabilisation qui va conférer une charge électrique aux particules, elle participe également à la formation de la couche de solvatation et elle régit les interactions entre les AuNP et les molécules environnantes. Il existe 2 types de stabilisants, ceux possédant une interaction de faible énergie (10 à 20 kJ.mol⁻¹) avec le cœur d'or (souvent des fonctions carboxyliques³⁷ et amines primaires⁶⁴, interactions de type électrostatique ou de van der Waals) et ceux possédant une énergie de liaison quasi covalente (≈ 200 kJ.mol⁻¹) pour le cœur d'or (groupements thiols⁶⁴). Nous avons émis l'hypothèse que la nature du stabilisant et son énergie de liaison avec le cœur était un paramètre crucial conditionnant la compatibilité entre les AuNP et le compartiment sanguin. La circulation sanguine est un milieu complexe dans lequel les AuNP peuvent interagir avec une grande variété de protéines et de cellules ce qui peut aboutir à une perte de l'efficacité thérapeutique de nanoparticules fonctionnalisées⁷³. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre les AuNP et deux protéines plasmatiques modèles l'albumine (protéine plasmatique principale et transporteur majoritaire de molécules endogènes et exogènes) et le fibrinogène (protéine de la coagulation dont l'adsorption est plus tardive). Ces deux protéines ont été sélectionnées en accord avec l'effet Vroman qui stipule que l'adsorption protéique est un système dynamique⁷⁴. Au cours de cette adsorption séquentielle, une couronne hétérogène se forme avec des protéines ayant une affinité croissante pour les AuNP. En premier lieu, nous avons étudié l'influence des protéines sur les propriétés physicochimiques des AuNP. La formation de la couronne protéique fut étudiée par le suivi de

la variation de la longueur d'onde de la bande de résonance plasmonique de surface qui reflète l'interaction des particules avec leur environnement et par le suivi du diamètre hydrodynamique des particules qui correspond à la somme des diamètres du cœur d'or, de la couche de stabilisation (ligands de surface) et de la couche de solvatation (eau, ions et molécules en interaction avec les particules et les stabilisants). Puis, en considérant les AuNP comme un ligand pour les protéines nous avons modélisé par quenching de fluorescence les paramètres thermodynamiques régissant la formation du complexe [AuNP,Protéine]. Enfin, l'hémolyse induite par les AuNP et les complexes [AuNP,Protéines] fut considérée. L'ensemble de ces travaux ont abouti à la publication d'un article dans le journal *International Journal of Pharmaceutics* (Article 3 : *Design of surface ligands for blood compatible gold nanoparticles: effect of charge and binding energy*) proposant les caractéristiques que doit présenter un ligand de surface pour favoriser l'hémocompatibilité des AuNP.

Article 3 : Design of surface ligands for blood compatible gold nanoparticles: effect of charge and binding energy

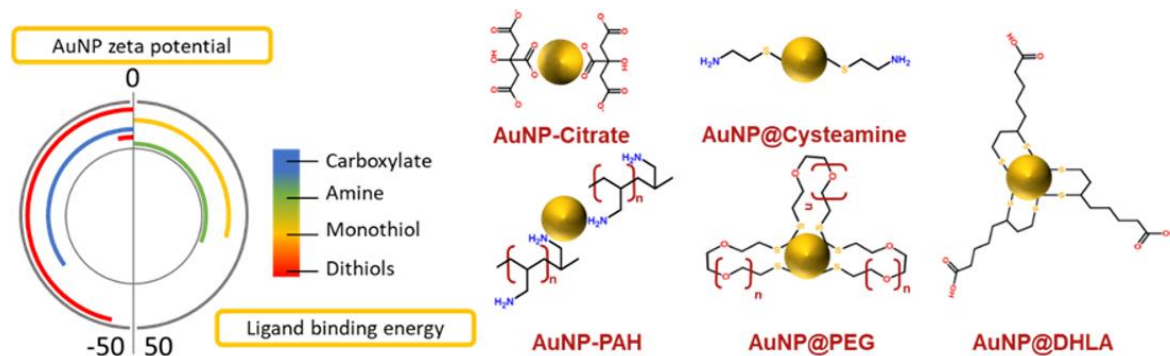
L'article 3 représente une étude de l'hémocompatibilité des AuNP colloïdales en fonction de leur ligand de surface

Cet article a été publié dans le journal *International Journal of Pharmaceutics* (I.F. = 5,875).

Jordan Beurton, Philippe Laval, Arnaud Pallotta, Thomas Chaigneau, Igor Clarot, Ariane Boudier

International Journal of Pharmaceutics volume 580, pages 119–244 (2020)

Graphical Abstract :



DESIGN OF SURFACE LIGANDS FOR BLOOD COMPATIBLE GOLD NANOPARTICLES: EFFECT OF CHARGE AND BINDING ENERGY

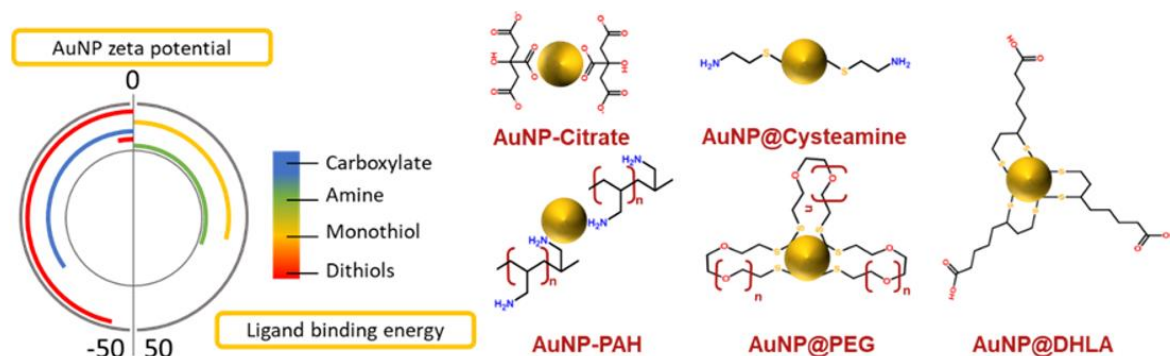
Jordan Beurton^{1,2}, Philippe Laval², Arnaud Pallotta¹, Thomas Chaigneau¹, Igor Clarot¹, Ariane Boudier^{1*}

Adresses

¹: Université de Lorraine, CITHEFOR, Nancy, France

²: Université de Strasbourg, Faculty of Medicine, Inserm UMR 1121 Biomaterials and Bioengineering, Strasbourg, France

*Corresponding author: ariane.boudier@univ-lorraine.fr



Highlights:

- Weakly stabilized and positively charged AuNP aggregate with proteins
- Antifouling ability carried by strongly capped, neutral and negatively charged AuNP
- Hemolysis increased by weakly stabilized and positively charged particles
- Hemolysis decreased by strongly capped and negatively charged particles

Abstract

Gold nanoparticles (AuNP) interaction with the blood compartment as a function of their charge and the binding energy of their surface ligand was explored. Citrate, polyallylamine and cysteamine stabilized AuNP along with dihydrolipoic acid and polyethylene glycol capped AuNP were synthesized and fully characterized. Their interactions with model proteins (human albumin and human fibrinogen) were studied. Complexes formed between AuNP and protein revealed several behaviors ranging from corona formation to aggregation. Protein fluorescence quenching as a function of temperature and AuNP concentration allowed the determination of the thermodynamic parameters describing these interactions. The hemolysis induced by AuNP was also probed: an increasing or a decreasing of hemolysis ratio induced by AuNP was observed as a function of protein corona formation. Taken together, our results drew up a composite sketch of an ideal surface ligand for blood compatible AuNP. This capping agent should be strongly bound to the gold core by one or more thiol groups and it must confer a negative charge to the particles.

Keywords: Inorganic Nanoparticles, Surface Chemistry, Protein Adsorption, Thermodynamic Parameters, Hemolysis

1. Introduction

Gold nanoparticles (AuNP) are part of the most developed and used nanomaterials because of their ease of synthesis and their characteristics. They are well defined by their physicochemical and optical properties. AuNP can be functionalized by biomolecules and drugs with important yields due to a huge surface over volume ratio (Daniel & Astruc, 2004). The abundance of possible ligands creates a wide variety of objects, in terms of surface charge (zeta potential) or hydrodynamic diameter. The newly synthesized particles are surrounded by a more or less displaceable shell depending on the ligand binding energy. Among their various uses, these particles can be used as biosensors, drug delivery systems or contrast agents (Mieszawska et al., 2013) involving their intravenous injection. The bloodstream is a highly complex medium in which AuNP can interact with a wide variety of proteins or cells. According to the Vroman's effect (Vroman, 1962), the interaction between AuNP and plasma proteins is a dynamic system. During this sequential adsorption, a heterogeneous corona is formed with proteins with an increasing affinity for the AuNP. This phenomenon determines the biological identity of the particles and manages not only their bioavailability and pharmacokinetics but also their possible toxicity (Wang et al., 2015). Several studies already probed the interaction of proteins with AuNP as a function of their size, shape, charge... As examples, the variation of the nanoparticle hydrodynamic diameter revealed an influence on their internalization in cells through endocytosis or micropinocytosis or in hemolysis induction (Purohit et al., 2016). Lacerda *et al.*, reported an increasing affinity between fibrinogen and citrate capped AuNP as a function of their hydrodynamic diameters (Lacerda et al., 2010). A shape dependence in the protein activation and cellular uptake was also described. Xie *et al.*, observed an increased internalization linked to AuNP shape (from stars and rods to triangles, respectively) (Xie et al., 2017). Quach and Kah demonstrated that gold nano-spheres, -stars and -rods bearing polyethylene glycol (PEG) groups were able to induce complement activation (Quach and Kah,

2017). Through all these studies, all types of interactions between NP and proteins have been reported, from the weakest (Van der Waals and/or hydrogen bonds) to the strongest (covalent bound) (Shemetov et al., 2012). Thus, ligand exchange phenomena (NP surface ligand vs blood protein), especially with low-energy surface stabilizers, are of particular importance for the protein corona formation. However, the influence of functional groups binding the NP gold core in terms of binding energy is rather poorly reported. Thus, our work aimed at filling the information gap on the influence of the ligand characteristics on AuNP blood compatibility. We hypothesized that this is a key factor that governs the stability of the particles as soon as they are injected into the bloodstream. Besides, the ability of the ligand, to be more or less displaced, induces a selection of the proteins forming the corona. Therefore, the binding energy of the ligand influences the plasmatic mean residence time of the particles and therefore their biodistribution and pharmacokinetics.

In this work, we considered that the prediction of AuNP blood compatibility is a multifactorial equation in which the variables are the ligand characteristics (binding energy and charged groups) and the protein characteristics. We synthesized five different types of AuNP with characteristics and ligands frequently described in the biomedical field. Thus, AuNP-citrate, stabilized through weak interactions with carboxylate groups, are often used as precursors for further functionalization steps through ligand exchange. AuNP stabilized by poly(allylamine) (PAH), a cationic polymer carrying primary amines able to bound the particle gold core were selected as models of positive nanoparticles with a weak ligand. AuNP stabilized by a cationic polymer can be used to create multilayered coated particles for a drug delivery purpose (Reum et al., 2010). We also selected AuNP capped by a ligand carrying one or more thiols. Positively charged particles were obtained with cysteamine. Here, the interaction with the gold core was predominantly driven by the thiol group thanks to sulfur atom avidity for gold largely greater than the one between amine and gold. PEG capping allowed the synthesis of neutral particles

and it is the gold standard for giving a protein antifouling ability to AuNP. Herein, a PEG bearing two thiol groups was chosen for better anchoring of the ligand on the gold core (Zopes et al., 2013). This also allowed the formation of looped PEG chains on the AuNP, which are known to have better biocompatibility, salt resilience and enhanced hydrophilicity (Du et al., 2019). AuNP were also synthesized using dihydrolipoic acid (DHLA), providing negatively charged particles with a strongly bound ligand (by two thiols per molecule). DHLA has the advantage of adding a carboxylic acid to AuNP surface allowing an easy functionalization through amide bond formation (Roux et al., 2005).

Based on the Vroman's effect, two different proteins were selected: albumin (firstly bound) and fibrinogen (latterly bound) as models (described in Table 1.) for probing AuNP-plasma proteins interaction. We investigated the physicochemical characterization of [AuNP, Protein] complexes as a function of particle charge and ligand binding energy using dynamic light scattering and spectrophotometry. The fluorescence quenching of albumin and fibrinogen at several temperatures and AuNP concentrations was measured. Thermodynamic parameters (Bi et al., 2004) of proteins interacting with anionic, cationic or neutral AuNP were determined. Lastly, the hemolysis induced by AuNP as a function of their characteristics was also probed. Our study showed that not only the particle charge but also the ligand binding energy determine the formation of the protein corona on NP. Those new objects display a different reactivity towards the blood compartment as observed in the hemolysis induction.

Table 1. Physicochemical parameters of human proteins used in this study.

Physicochemical properties	Albumin	Fibrinogen
Molecular mass (g.mol ⁻¹)	69 000	340 000
Isoelectric point	4.7	5.8
Net charge at pH = 7.4 (mV)	-26	-38
Number of tryptophan residues accessible for quenching	1	25 ^a
Dimensions (nm)	7 × 6 × 4 ^b	9 × 47 × 6 ^c
Shape	Heart	Rodlike

a:(Gonçalves et al., 2007) b:(Erickson, 2009) c: (Cieśła et al., 2013)

2. Materials & Methods

2.1. Reagents and standards

All reagents and solvents were of analytic grade and were used without further purification. Ultrapure deionized water ($> 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) was used for the preparation of all solutions. Polyallylamine hydrochloride (PAH) with average molecular mass of 17,500, cysteamine hydrochloride, dihydrolipoic acid (DHLA), sodium citrate, di-thiolated polyethylene glycol (PEG) with an average molecular mass of 8000, HAuCl_4 , NaBH_4 , human serum albumin and human fibrinogen were supplied by Sigma Aldrich. Wistar rat whole blood collected in heparin blood collection tubes was provided by our laboratory animal house. Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , KCl and NaCl were purchased from VWR Chemicals. Phosphate buffered saline solution (PBS) at 0.15 M was prepared as follows: $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 6.68 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 1.47 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{NaCl}] = 138.00 \times 10^{-3} \text{ M}$, and $[\text{KCl}] = 2.68 \times 10^{-3} \text{ M}$, final pH was adjusted to 7.40. 50 nM Human albumin and human fibrinogen were prepared by diluting a 1 μM stock solution in PBS.

2.2. AuNP synthesis

Citrate stabilized AuNP were synthesized in aqueous solution according to our previous work (Tournebize et al., 2012). Under inert atmosphere, 1 mL of HAuCl_4 solution (10 mg/mL) was added into 90 mL of water and then 2 mL of sodium citrate 55 mM. The solution was stirred for 1 min then 1 mL of NaBH_4 19 mM was added and the solution was stirred for 10 min. AuNP DHLA and PEG were obtained through ligand exchange with previously described AuNP. 10 mL of 60 mM DHLA or dithiolated PEG solutions prepared in NaOH 0.5 M were added to 25 mL of AuNP citrate. After an overnight reaction, AuNP were dialyzed twice against PBS for 24 h. AuNP-PAH were synthesized with the same method as AuNP citrate using 1 mL of 87 mM of PAH solution as stabilizing ligand. AuNP cysteamine were synthesized by a two steps reduction method. At first, 90 mL of ultra-pure water added with 1 mL of HAuCl_4 solution (10

mg/mL) and 1 mL of cysteamine hydrochloride 27 mM. This solution was heated using a heating sand bath (250 °C) and a reflux system until it becomes colorless, corresponding to Au³⁺ reduction to Au⁺ by thiols. The second reduction Au⁺ to Au⁰ was performed by adding 50 µL of 19 mM of NaBH₄. Ionic gold quantification was performed on every synthesis with a previously developed in house method (Pallotta et al., 2018). Synthesis yields were found above 99.6 % for each kind of AuNP.

2.3. AuNP characterization

Colloidal gold nanoparticles were characterized after synthesis without any dilution step. UV–vis spectrophotometer (UV-1800 Shimadzu) was used for spectra recordings and absorbance measurements. The hydrodynamic diameter in volume mode (D_h) and zeta potential (ζ) of AuNP were measured at 20 ± 1 °C with a backscattering detection angle of 173°. Zeta potential was calculated after the conversion of electrophoretic mobility values measured by laser Doppler velocimetry using the Smoluchowski's equation. Both, DLS and laser Doppler velocimetry measurements were conducted on a Zeta Sizer nanoseries Nano-ZS fitted with a helium-neon laser performing at 633 nm (Malvern Instruments, UK). Transmission Electron Microscopy (TEM) images were recorded using a Philips CM20 instrument with a LaB6 cathode at 200 kV and with CF200-CU carbon covered copper grids. DigitalMicrograph software was used to determine AuNP cores diameters, D_c, by measuring at least 150 individualized nanoparticles.

2.4. Interaction of AuNP and proteins studied by spectrophotometry and dynamic light scattering

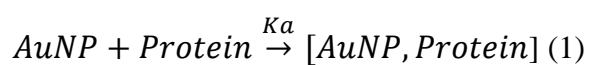
Concentrations of AuNP ranging from (3.5 nM to 21 nM for Citrate, PAH, Cysteamine stabilized AuNP and DHLA, PEG capped AuNP), corresponding to a quantity of 10¹² to 10¹³ particles per samples were used. AuNP concentrations were comparable to those used in

biodistribution studies after intravenous injection. For example, (Zhang et al., 2009) and (Semmler-Behnke et al., 2008) studied AuNP biodistribution in mice and rats after injection of quantities ranging from 1×10^{12} to 9×10^{13} and 4×10^{12} to 4×10^{13} per animals respectively. All AuNP dilutions were prepared in PBS 0.15 M pH = 7.4 containing albumin or fibrinogen with a final concentration of 50 nM. Visible spectra (400 – 800 nm) and hydrodynamic diameters were acquired just after mixing at 20 ± 1 °C. Results are reported as the main hydrodynamic diameters measured in volume. External layer thickness (sum of the ligand layer, the protein corona and the solvation shell) was determined by subtracting the AuNP D_c to the D_h of [AuNP, Protein] complexes.

2.5. Fluorescence quenching study and constants determinations.

The analysis of AuNP and proteins interaction was performed through fluorescence quenching experiments as a function of temperature (4 °C, 20 °C, 37°C and 50 °C) and AuNP concentration (3.5 nM to 21 nM). Albumin and fibrinogen concentrations were kept constant (50 nM). This concentration was chosen greater than AuNP concentration and with a sufficient fluorescence signal for quenching studies. Proteins solutions, PBS and AuNP were pre-incubated at 4 °C, 20 °C, 37°C or 50 °C before mixing and measurements. The fluorescence intensity was measured immediately after sample preparation using a quartz cuvette with a light path 10x4 mm (Hellma Analytics, Müllheim, Germany). Hitachi F-2000 Fluorescence Spectrophotometer equipped with a Xenon lamp and with a temperature-controlled analysis chamber was used to perform the assay. The excitation and emission wavelengths were set at 280 ± 5 nm and 340 ± 5 nm, respectively. Sensitivity was set in high mode for albumin conditions and on medium for fibrinogen.

The protein fluorescence quenching relied on the interaction of albumin or fibrinogen with AuNP assimilated to a ligand according to the following equation (1):



K_a being the affinity constant. For referring to the formation of this complex, in the text the following notation was used [AuNP-X/@X, albumin or fibrinogen], where -X or @X represent the stabilizing or capping ligand under consideration, respectively.

The fluorescence quenching mechanism was determined with the Stern-Volmer equation (2):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [AuNP] = 1 + K_{SV} [AuNP] \quad (2)$$

In which, F_0 and F are the fluorescence intensities of albumin or fibrinogen in the absence and presence of quencher (AuNP), respectively. K_{SV} is the Stern-Volmer quenching constant, K_q the quenching constant, $[AuNP]$ the molar concentration of AuNP and τ_0 is the lifetime of albumin and fibrinogen without quencher, which was considered as 10^{-7} s.

Static quenching allows the calculation of affinity constant (K_a) and Hill coefficient (n) with the following equation (3):

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_a + n \log [AuNP] \quad (3)$$

Previously mentioned constants were determined by plotting $\log \frac{F_0 - F}{F}$ versus $\log [AuNP]$. Slopes and intercepts of the resulting curves represented Hill coefficient and $\log K_a$ respectively.

Entropy (ΔS) and enthalpy (ΔH) variations were determined with the Van't Hoff model.

Previously mentioned constants were determined by plotting $\ln K_a$ as a function of $\frac{1}{T}$, where

T is the temperature in K.

Slopes and intercepts of the resulting curves respectively represented $\frac{-\Delta H}{R}$ and $\frac{\Delta S}{R}$.

R being the perfect gas constant taken equal to $8.314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$.

Gibbs free energy (ΔG) was calculated with the following equation (4):

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad (4)$$

2.6. AuNP induced hemolysis

AuNP ability to induce hemolysis was adapted from a previously described method (Pallotta et al., 2017) using blood from a Wistar male rat. Briefly, Red Blood Cells (RBC) washing was performed after centrifugation (20 min, 3000 rpm, 4 °C) by substituting the plasma by the same volume of NaCl 0.9 % (m/v). A stock solution was prepared by mixing 1 mL of previously described RBC solution and 1.25 mL of NaCl 0.9 % (W/V). Working solutions were obtained by a 25-fold dilution on PBS alone, with albumin or fibrinogen. Positive and negative controls were obtained through the same dilutions in ultra-pure water or PBS, respectively. Protein (albumin and fibrinogen) final concentration was 50 nM and AuNP concentration ranged from 3.5 to 21 nM. PBS was preferred instead of NaCl 0.9 % to ensure the same proteins protonation state as *in vivo*. Samples were prepared in triplicates and incubated in a shaking and heating water bath (80 oscillations.min⁻¹ and 37 °C) during 2 h. The hemolysis rate was determined by measuring the absorbance of the samples at $\lambda = 541$ nm after centrifugation (10 min, 5 000 rpm). Hemolysis rates induced by AuNP were expressed as a percentage of the hemolysis found with the positive control.

3. Results and Discussion

3.1 Nanoparticles characterization

Several types of gold nanoparticles were synthesized using stabilization agent of various chemical nature with increasing binding energy for Au core: carboxylate groups for citrate ions, amine groups for PAH, thiol groups for cysteamine and dithiol groups for DHLA and PEG. Their physicochemical characterization was performed, and the results are presented in Table 2. and Figure 1. Spectrophotometric properties of these particles showed a single plasmon band (λ_{max}) characteristic of metallic nanoparticles. No other peak was detected, meaning that little to none aggregation was observed. This was confirmed by transmission electron microscopy observations that showed spherical and individualized particles. Hydrodynamic diameters (Dh) and core diameters (Dc) measurement allowed the determination of AuNP stabilization and solvation layers thickness. The use of different ligands during synthesis provided negatively charged NP (AuNP-Citrate and @DHLA), or neutral particles (AuNP@PEG) or positively charged NP (AuNP-PAH and @Cysteamine)

Table 2: Physicochemical characterization of colloidal gold nanoparticles (n = 3 on three independent syntheses).

Physicochemical parameter	AuNP- Citrate	AuNP- PAH	AuNP@ Cysteamine	AuNP@ DHHLA	AuNP@ PEG
λ max (nm)	514 ± 1	528 ± 2	522 ± 3	521 ± 2	518 ± 1
Hydrodynamic diameter Dh (nm)	5.8 ± 0.9	11.9 ± 0.7	10.5 ± 1.5	8.4 ± 0.9	28.5 ± 0.5
Core diameter Dc (nm)	2.7 ± 0.8	7.4 ± 2.1	7.3 ± 2.0	5.0 ± 0.7	3.7 ± 0.8
Zeta potential ζ (mV)	-32 ± 1	31 ± 3	28 ± 2	-46 ± 3	-4 ± 2
Ligand binding Energy (kJ.mol ⁻¹)	11 ^a	25 ^b	188 ^c	188 ^c	188 ^c

a: energy per interaction Au-O involved in the stabilization of the gold core by citrate ions (Al-Johani et al., 2017), b: energy per interaction Au-N (Nuzzo et al., 1987) involved in the stabilization of the gold core by poly(allylamine), c: binding energy of a single thiol on AuNP gold core (Nuzzo et al., 1987), note that in the case of DHHLA and PEG capping two thiols each ligand molecule is bound by two thiols.

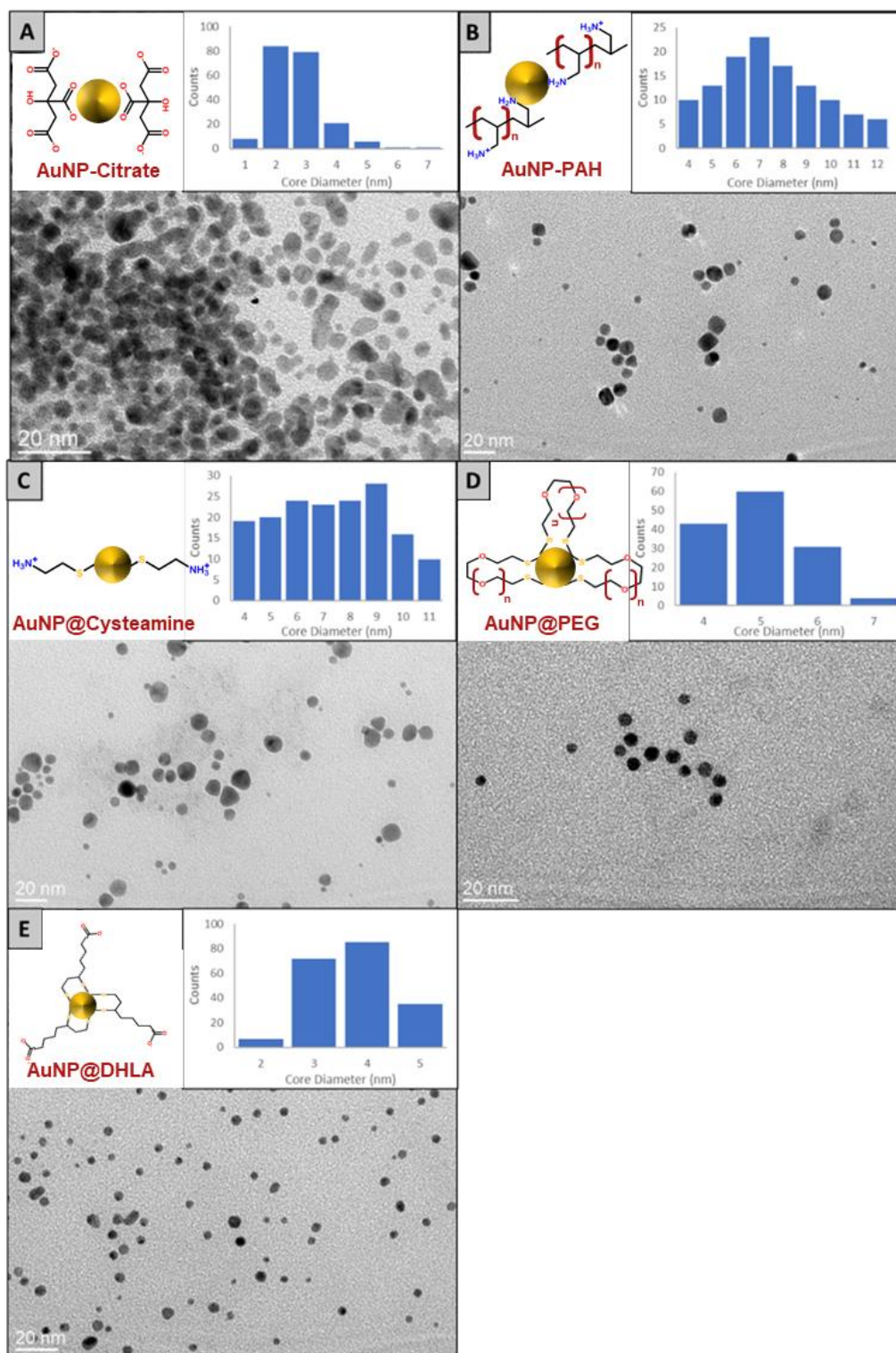


Figure 1. Observation by TEM of AuNP stabilized by citrate (A), PAH (B), capped by cysteamine (C), DHHLA (D) and PEG (E) and histograms representing AuNP Dc measured on at least 150 individualized particles. Schematic representations of the studied nanoparticles are also represented.

3.2 Protein effect on AuNP physicochemical characterization

Albumin and fibrinogen were selected as models for studying the interaction of AuNP with blood proteins. Albumin is known to be a ubiquitous carrier able to rapidly bound on NP. In a second step, this non-specific binding is replaced by complexation with other more specialized blood proteins such as fibrinogen corresponding to the Vroman's effect. The study of the physicochemical characterization of AuNPs in the presence of these two proteins represents a first step towards understanding the fate of AuNP in blood.

3.2.1 Modification of AuNP optical properties

The interaction of [AuNP, Protein] and its effect on their optical properties were studied by visible spectrophotometry (Figure 2.). Variation of the Surface Plasmon Band was studied by mixing an increasing concentration of AuNP with a constant concentration (50 nM) of either albumin or fibrinogen. This physicochemical parameter is specific to metallic nanoparticles and gives information on their size, their form, their surrounding medium, and neighbors particularly the inter-nanoparticulate distance (Amendola et al., 2017). As reported in the histograms a redshift of the plasmon band was observed, corresponding to NP surrounding modification due to proteins. The highest increases in maximal wavelength were observed for citrate, PAH and cysteamine AuNP (Figure 2. A, B, C) reflecting a significant impact on the physicochemical properties of these particles after protein binding. Plasmon band broadening was related to an increase of AuNP size dispersion (Moore and Goettmann, 2006) due to the formation of a protein corona around them and/or to the formation of aggregates. For DHLA and PEG AuNP (Figure 2. E, F) these changes were less pronounced representing a limited impact of proteins on these particles.

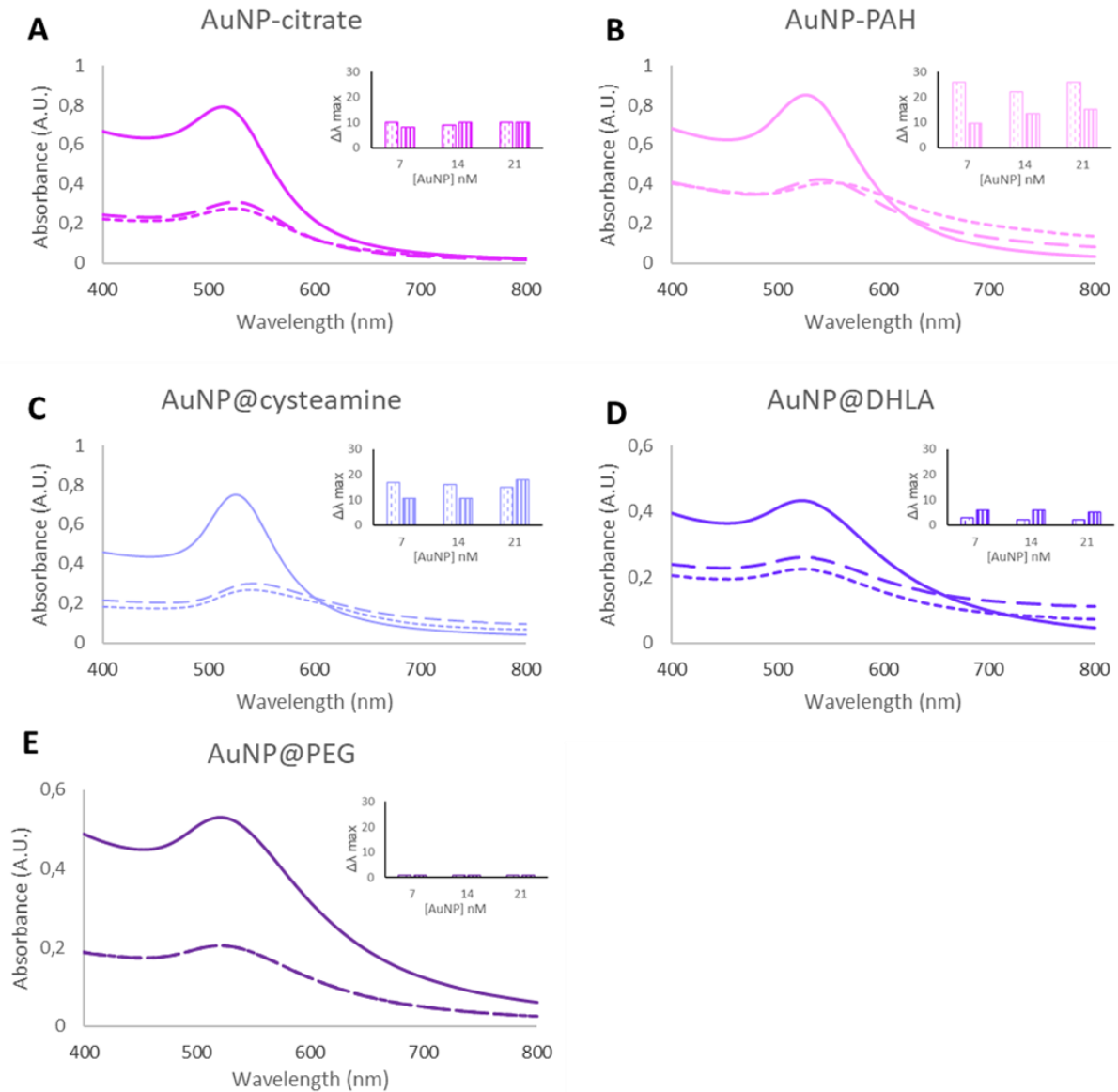


Figure 2. Typical visible spectra of citrate, PAH, cysteamine AuNP(A,B,C) at 70 nM and DHLA, PEG AuNP at 50 nM (solid line) and spectra of AuNP (21 nM) mixed with either albumin (short dashed lines) or fibrinogen (long dashed lines) at 50 nM. Histograms represent the variation of the Surface Plasmon Band wavelength after mixing AuNP (at 7, 14, and 21 nM) with albumin (short dashed) or fibrinogen (long dashed) at 50 nM.

3. 2.2 Variation of Dh induced by proteins

The variation of Dh as a function of AuNP concentration with either albumin or fibrinogen was probed (Figure 3.). Differences between AuNP Dc and Dh gave an estimation of the surrounding layer thickness. This external layer thickness was defined as the sum of the ligand layer, the protein corona and the solvation shell. It was calculated only when particles were not aggregated. Values of typical diameters measured or estimated at AuNP concentration of 7 nM are listed in Table 3. AuNP-citrate Dh were found more important in presence of albumin than without. Still, for this kind of AuNP, the Dh stayed stable at any NP concentration, suggesting the formation of a stable protein corona on individualized particles. At the opposite, as far as AuNP-citrate are concerned, the formation of increasingly important aggregates was observed in the presence of fibrinogen. For PAH stabilized nanoparticles large aggregates over 500 nm were observed in both protein conditions at any AuNP concentrations revealing an important instability of these particles in a biological-like medium. Hydrodynamic diameters of cysteamine nanoparticles increased gradually for both albumin and fibrinogen conditions, highlighting an aggregation mediated by AuNP concentration. Fibrinogen tendency to form large aggregates or to induce the formation of thicker corona compared to albumin is due to its shape and dimensions (Table 1.), in fact, this protein is able to bridge several nanoparticles or to be organized as a loop on a single particle (Deng et al., 2012). Hydrodynamic diameters of DHLA and PEG particles were found to be stable over the whole range of the studied AuNP concentration.

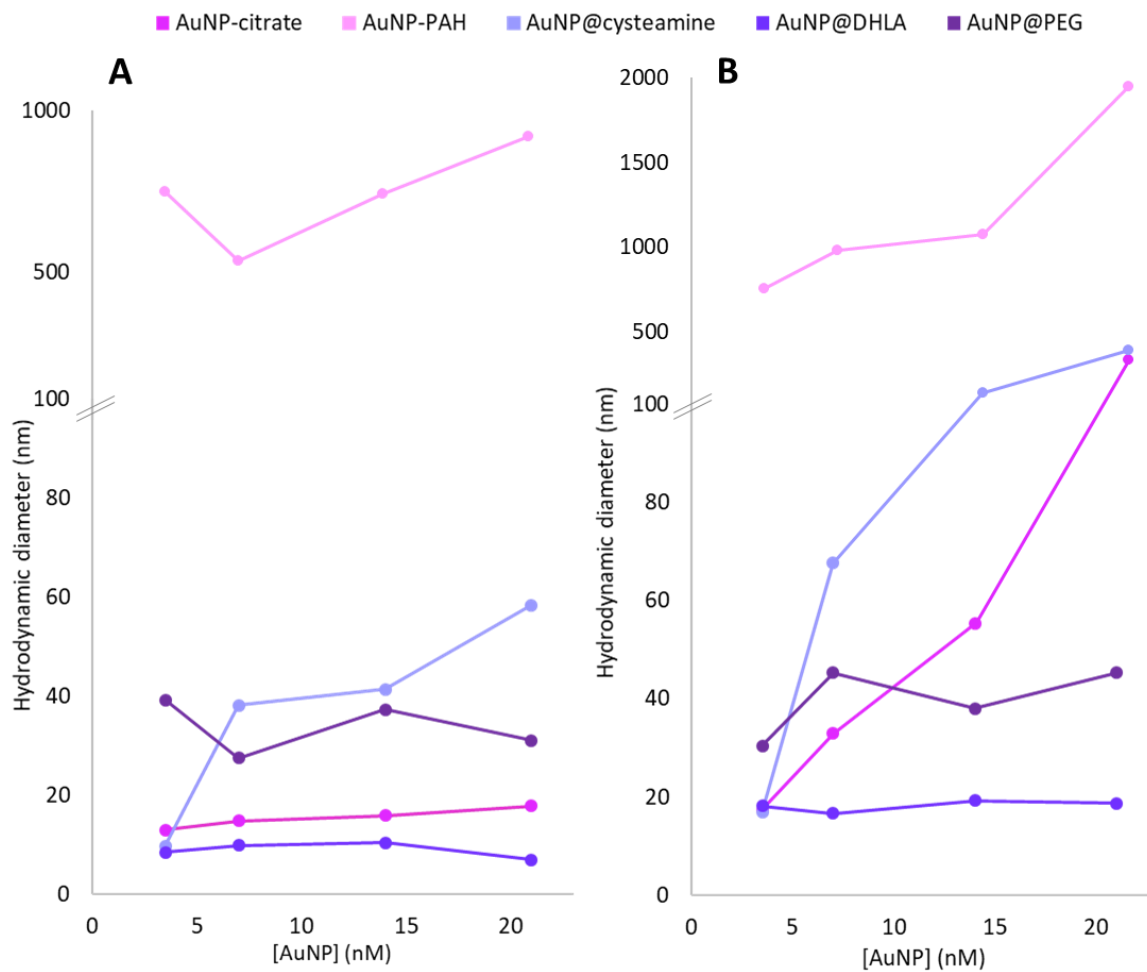


Figure 3. AuNP Dh measured by Dynamic Light Scattering. AuNP concentrations were increased from 3.5 nM to 21 nM in interaction with either albumin (A) or fibrinogen (B) which concentrations were fixed at 50 nM.

Table 3. AuNP Dh and external layer thickness at a concentration of 7 nM.

Protein	Dh (nm)		External layer thickness (nm)		
	none	Albumin	Fibrinogen	Albumin	Fibrinogen
AuNP-citrate	5.8	14.8	32.9	12.1	Aggregation above 3.5 nM
AuNP-PAH	11.9	537	981	Aggregation	
AuNP@Cysteamine	4.4	38.2	67.7	Aggregation above 3.5 nM	
AuNP@DHLA	8.4	9.9	16.7	4.9	11.7
AuNP@PEG	28.3	27.5	45.3	23.8	41.6

3.3. Mechanism of AuNP binding to protein

As reported in Table 1, albumin and fibrinogen both carry tryptophan residues which fluorescence can be quenched as a function of the presence of various compounds. Then, a thorough characterization of AuNP-protein interactions was allowed through fluorescence study. Thermodynamics parameters, quenching, K_{SV} , and affinity, K_a , constants were determined for both proteins and as a function of AuNP surface ligands.

3.3.1. Quenching constants

Fluorescence quenching studies relied on the native fluorescence (F_0) of proteins mainly carried by tryptophan residues. The addition of molecules or particles able to bind on protein induces a fluorescence quenching. Then, a decreasing fluorescence intensity (F) was observed when AuNP concentration was increased. Plotting of F_0/F as a function of AuNP concentrations (Figure 4.) allowed the determination of Stern-Volmer constant (K_{SV}) for albumin and fibrinogen. In all the studied conditions, the quenching rate constant (K_q) was greater than the maximum diffusion collision quenching rate constant ($2 \times 10^{10} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ (Bi et al., 2004)) meaning that the fluorescence quenching relied on the formation of a static complexes ([AuNP, Albumin] and [AuNP, Fibrinogen]). For a static quenching, the interaction site between AuNP and protein is located in the close vicinity (between 10 Å and 100 Å (Swathi and Sebastian, 2009)) of the fluorophores (tryptophan) and the distance between protein and quencher stays constant, on the contrary to a collisional or dynamic complex.

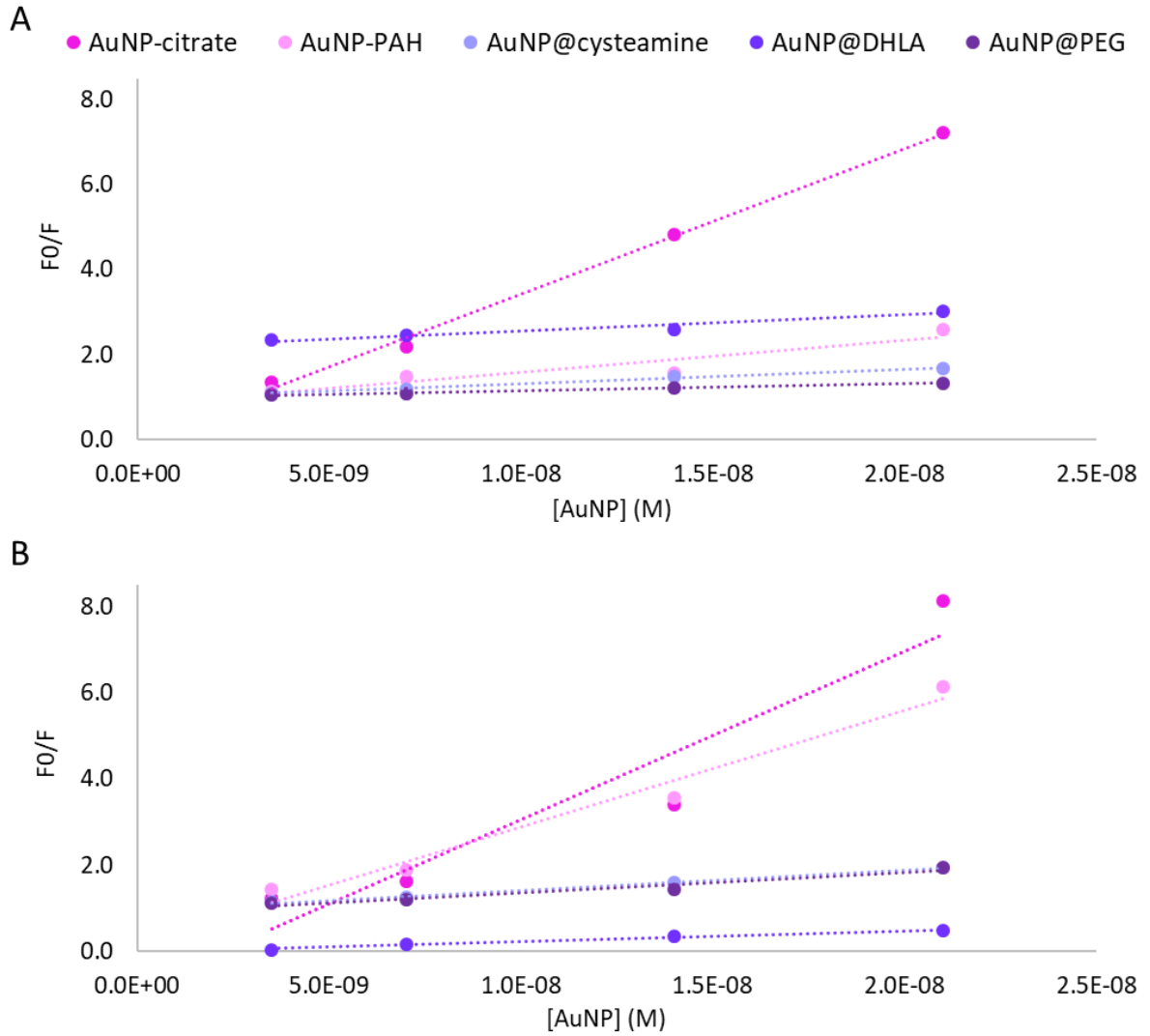


Figure 4. Stern-Volmer plot at 37 °C determined through fluorescence quenching of albumin (A) and fibrinogen (B) by an increasing concentration of AuNP.

Table 4. Albumin and fibrinogen fluorescence quenching constants at 37 °C. R stands for the correlation coefficient.

		AuNP ligand				
		Citrate	PAH	Cysteamine	DHLA	PEG
K_{sv} (L.mol ⁻¹)	Albumin	3.4×10^8	7.5×10^7	3.4×10^7	3.8×10^7	1.6×10^7
	Fibrinogen	3.9×10^8	2.7×10^8	4.7×10^7	2.6×10^7	5.0×10^7
K_q (L.mol ⁻¹ . s ⁻¹)	Albumin	3.4×10^{15}	7.5×10^{14}	3.4×10^{14}	3.8×10^{14}	1.6×10^{14}
	Fibrinogen	3.9×10^{15}	2.7×10^{15}	4.7×10^{14}	2.6×10^{14}	5.0×10^{14}
R	Albumin	0.9984	0.9343	0.9964	0.9708	0.9896
	Fibrinogen	0.9553	0.9861	0.9974	0.9932	0.9869

3.3.2 Thermodynamics constants of AuNP proteins interaction

Plotting of $\log \frac{F_0-F}{F}$ as a function of $\log[AuNP]$ values at 37 °C (Figure 5.) gave the parameters listed in Table 5. Hill coefficient can also be defined as a measure of binding cooperativity. The value lower than 1 obtained for [AuNP@DHLA, Albumin] corresponds to an anticooperative binding indicating that the association energy per particle progressively decreases with further protein adsorption. For AuNP citrate, PAH, cysteamine, Hill coefficient was found greater than 1 meaning that their interaction with either albumin or fibrinogen relied on a cooperative binding. The association energy increases gradually as long as particles bind on proteins. In the case of [AuNP@DHLA, Fibrinogen] and [AuNP@PEG, Fibrinogen], Hill coefficient was equal to 1 indicating that the association energy of these complexes was not varying as a function of protein adsorption. Besides, ΔG negative values revealed a spontaneous formation of all the [AuNP, Protein] complexes. Affinity constant (K_a) was found greater than 10^3 (excepted for [AuNP@DHLA, Albumin]), indicating a high affinity between each type of AuNP and either albumin or fibrinogen. In the case of the [AuNP@DHLA, Albumin], a low K_a value was found, suggesting a moderate affinity for the complex formation.

Entropy and enthalpy variations signs and values (ΔS and ΔH , respectively) allowed the determination of the types of chemical interactions between AuNP and proteins. The negative ΔS and ΔH values obtained for [AuNP-citrate, Albumin], [AuNP-PAH, Albumin], [AuNP@cysteamine, Albumine], [AuNP@DHLA, Albumin] and [AuNP-PAH, Fibrinogen] are characteristics of an interaction based on Van der Waals and/or H-bond formation. These weak energy interactions are frequently managing contacts between particles and biomolecules. They allow stabilizing interactions between the solvating layers of each object as well as between their respective surfaces. The positive values of ΔS and ΔH are linked to hydrophobic interactions. A positive ΔS and a positive or negative value for ΔH indicate an ionic interaction.

In this context, definitions of these two forces are important to understand the precise nature of the interactions leading to the complex formation. Hydrophobic association (Ross and Subramanian, 1981) is exclusively referring to the partial withdrawal of a nonpolar group from water and/or from the solvation layers of AuNP or proteins and not to an interaction between nonpolar groups themselves. The ionic association represents a neutralization of opposite charges (Manning, 1978). Here, the scale at which this interaction occurs is an important consideration. This must be understood as an electrostatic interaction between the particle and the protein and not between two net charges present on the different objects. Considering those definitions, hydrophobic and ionic interactions found for [AuNP@PEG, Albumin], [AuNP-citrate, Fibrinogen] and [AuNP@cysteamine, Fibrinogen] relied on the modification of the species (non-polar and charged groups or ions) involved in the solvation layers of AuNP and the protein resulting from the association. The ionic association found for [AuNP@DHLA, Fibrinogen] is based on the interaction of negatively charged AuNP@DHLA (carboxylate groups) and positively charged residues of fibrinogen. Concerning [AuNP@PEG, Fibrinogen] an analogous phenomenon explains the ionic interaction found. It has already been described that a PEG capping layer does not offer a total screening of charge (Wang et al., 2013) carried by the particle gold core. In the case of AuNP@PEG, the electron cloud of the core may stay mobilizable for electrostatic interactions.

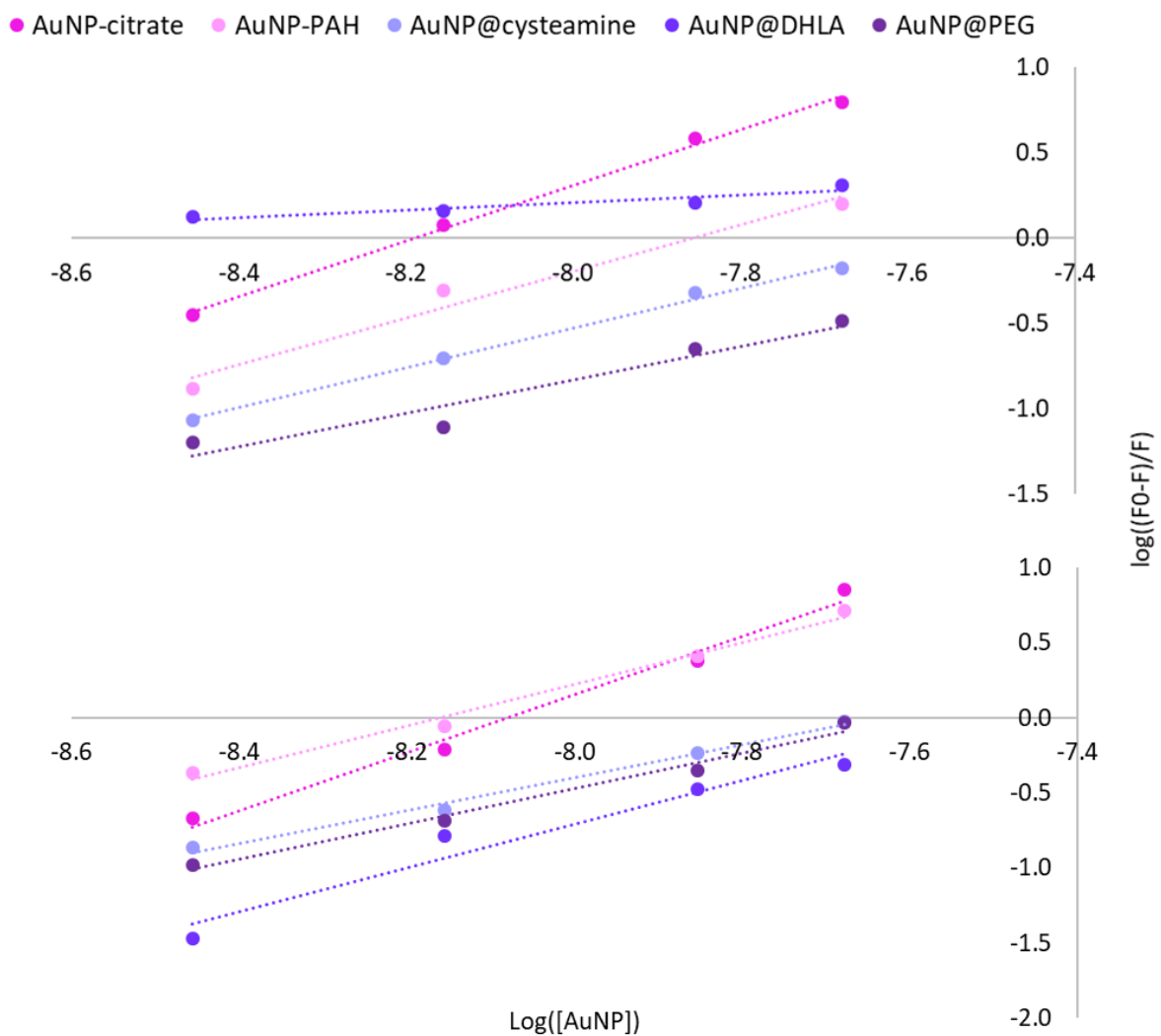


Figure 5. K_a plot at 37 °C determined through fluorescence quenching of albumin (A) and fibrinogen (B) by an increasing concentration of AuNP.

Table 5. Thermodynamics constants of AuNP- albumin or fibrinogen complexation at 37°C

		AuNP ligand					
		Protein	Citrate	PAH	cysteamine	DHLA	PEG
Hill coefficient	Albumin	1.6	1.2	1.2	0.2	1.0	
	Fibrinogen	2.3	1.5	1.3	1.0	1.2	
Ka	Albumin	1.8×10^{13}	4.8×10^{10}	6.3×10^8	8.1×10^1	3.1×10^7	
	Fibrinogen	1.7×10^{18}	3.6×10^{12}	8.1×10^9	6.1×10^7	2.5×10^9	
ΔS ($J.K^{-1}.mol^{-1}$)	Albumin	-432	-227	-501	-88	821	
	Fibrinogen	574	-278	189	225	123	
ΔH ($kJ.mol^{-1}$)	Albumin	-200	-106	-208	-37	207	
	Fibrinogen	69	-157	104	-45	-18	
ΔG ($kJ.mol^{-1}$)	Albumin	-65	-35	-53	-9	-48	
	Fibrinogen	-54	-52	-48	-50	-56	
Interaction	Albumin	H bound and Van Der Waals bound				Hydrophobic /ionic	
	Fibrinogen	Hydrophobic /ionic	H bound and Van Der Waals bound	Hydrophobic / ionic	Ionic	Ionic	

3.4 AuNP interaction with blood

AuNP were incubated with RBC without (Figure 6. A) or with albumin (Figure 6. B) and fibrinogen (Figure 6. C) to probe their ability to induce hemolysis. For each condition and all AuNP types, hemolysis was found increasing as a function of AuNP concentration.

In the first condition without protein (Figure 6. A), two opposite behaviors were identified. Citrate and PAH stabilized and cysteamine capped AuNP induced a significant level of hemolysis greater than 10 % from the lowest concentration. The mechanisms explaining these results are based on AuNP surface ligands. It is commonly known that citrate ions with the lowest binding energy for NP gold core (Table 2) are forming an easily displaceable shell. These particles strongly interacted with RBC through ligand exchange with their membrane components such as sialic acid. On the other side, cysteamine, a strongly bound ligand, could not be removed. These positively charged NP interacted with negatively charged RBC membranes through electrostatic interactions. PAH, an intermediate strength ligand between carboxylic acid and thiol reacted through a combination of ligand exchange and charge interaction. Whereas for DHLA and PEG capped AuNP, hemolysis greater than 10 % was generated only at the highest concentration. Here, those particles are capped by non-displaceable ligands carrying two thiols. The low hemolysis rate found also relied on the negative charge of AuNP@DHLA and the steric hindrance provided by AuNP@PEG. Here, AuNP induced hemolysis was driven by two factors, ligand binding energy and the particle charge.

Addition of either albumin (figure 6. B) or fibrinogen (Figure 6. C) during the assay revealed a protein influence on the AuNP induced hemolysis. Considering the previous results showing the spontaneous formation of the static complex [AuNP, Protein], hemolysis should now be considered as being generated by new objects resulting from this association. The two previously described behaviors were still found. Concerning citrate and PAH stabilized AuNP

and cysteamine capped AuNP at a concentration greater than 7 nM, hemolysis was found increased in presence of the proteins. The positive binding cooperativity (Hill coefficient, $n > 1$) certainly promoted the interaction between the [AuNP, Protein] complexes and RBC. Furthermore, for those particles, the hemolysis ratio was more important with fibrinogen. This could be explained by the strongest affinity constants (K_a) and higher positive binding cooperativities found for fibrinogen compared to albumin, leading to the formation of larger aggregates.

On the other hand, hemolysis generated by [AUNP@DHLA, Albumin], [AUNP@DHLA, Fibrinogen], [AUNP@PEG, Albumin] and [AUNP@PEG, Fibrinogen] complexes was lower than the one induced by the 3 others particles. The values were not significantly different from the negative control at low AuNP concentration. Even if the formation of static complexes between those particles and proteins has been identified, spectrophotometric and dynamic light scattering studies demonstrated a limited modification of AuNP physicochemical parameters induced by proteins. Fluorescence quenching gave Hill coefficient values less than or equal to one, suggesting that protein corona surrounding AuNP@DHLA and AuNP@PEG did not promote the interaction of [AUNP@DHLA, Albumin], [AUNP@DHLA, Fibrinogen], [AUNP@PEG, Albumin] and [AUNP@PEG, Fibrinogen] complexes with RBC.

Taken altogether, these results fully described [AuNP, Protein] complexes interaction. Indeed, the influence of proteins on nanoparticle characterization was probed through spectrophotometric and dynamic light scattering studies. An important modification of citrate and PAH stabilized and cysteamine capped AuNP physicochemical parameters was observed in the presence of proteins. Weakly stabilized citrate AuNP remained in the nanoparticle form with albumin but were aggregated with fibrinogen, showing that the protein nature is also an important parameter (Zhang et al., 2014). Also, this study points out that working on solely albumin represents a limited model for the study of protein - nanoparticle interaction. Positively

charged AuNP (PAH and cysteamine) formed aggregates with either albumin or fibrinogen. Other studies have already shown such results. For example, it has been demonstrated that cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) stabilized AuNP aggregate with albumin through electrostatic interactions (Boulos et al., 2013; Wang et al., 2019). Besides, we showed here, that this aggregation also depends on the binding energy of the AuNP surface ligands. Impact of the nanoparticles on the native fluorescence of proteins allowed quenching studies and the determination thermodynamics constants describing those interactions. It has been shown that the corona protein formation on AuNP is a dynamic phenomenon responding to the Vroman's effect. At first, AuNP interact with unspecialized protein such as albumin and then, they tend to be bound by other more specialized proteins. In this study, a higher affinity was found between all particles and fibrinogen rather than albumin. We also demonstrated that this affinity depends on the nature of the AuNP surface ligand. Lastly, many studies described the formation of protein corona on AuNP as a function of protein nature, of NP hydrodynamic diameter (Xiao et al., 2018) or medium conditions such as pH (Sotnikov et al., 2019). The conditions of corona formation, its evolution over time or its impact on the bioavailability of nanoparticles were previously published. In this work, we proved that hemolysis can be strengthened by the formation of this protein corona and to the best of our knowledge this article is the first to report this behavior.

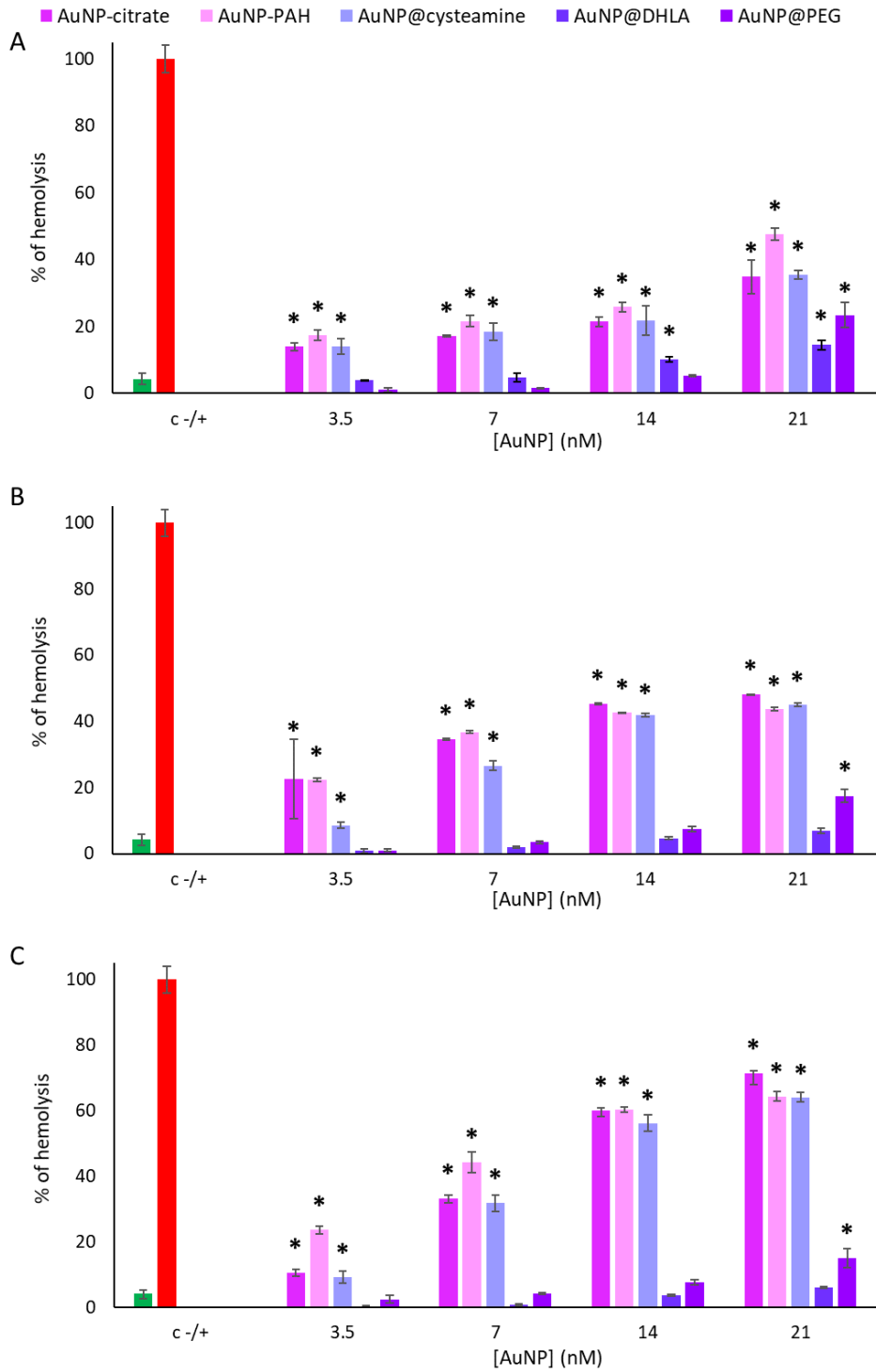


Figure 6. Hemolysis ratio (n = 3, errors bars represent the standard deviation) induced by an increasing concentration of AuNP in PBS (except for negative and positive controls) without proteins (A), or with either albumin at 50 nM (B) or fibrinogen at 50 nM (C). Statistical analyses were performed through two-way ANOVA followed by a post-hoc Bonferroni test (* p < 0.001 vs negative control)

Conclusion

Pulled together, our results drew up of the composite sketch of an ideal surface ligand for blood compatibles AuNP. The best capping agent should be strongly bound to the gold core by one or more thiols group and it must confer a negative charge to the particles.

Further studies are still required to fully describe the influence of AuNP surface ligand in the interaction with the blood compartment. Our future works will focus on AuNP effect on the coagulation and the inflammatory response. Indeed, thrombin activation as a function of AuNP nature or with the proteins of the complement pathway will be studied.

Acknowledgments

Authors thank laboratory animal house (ACBS) for providing rat whole blood. The authors also acknowledge “Region Grand Est” for financial support.

Declarations of interest: none

References

- Al-Johani, H., Abou-Hamad, E., Jedidi, A., Widdifield, C.M., Viger-Gravel, J., Sangaru, S.S., Gajan, D., Anjum, D.H., Ould-Chikh, S., Hedhili, M.N., Gurinov, A., Kelly, M.J., El Eter, M., Cavallo, L., Emsley, L., Basset, J.-M., 2017. The structure and binding mode of citrate in the stabilization of gold nanoparticles. *Nat. Chem.* 9, 890–895. <https://doi.org/10.1038/nchem.2752>
- Amendola, V., Pilot, R., Frascioni, M., Maragò, O.M., Iatì, M.A., 2017. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. *J. Phys. Condens. Matter* 29, 203002. <https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa60f3>
- Bi, S., Ding, L., Tian, Y., Song, D., Zhou, X., Liu, X., Zhang, H., 2004. Investigation of the interaction between flavonoids and human serum albumin. *J. Mol. Struct.* 703, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.05.026>
- Boulos, S.P., Davis, T.A., Yang, J.A., Lohse, S.E., Alkilany, A.M., Holland, L.A., Murphy, C.J., 2013. Nanoparticle–Protein Interactions: A Thermodynamic and Kinetic Study of the Adsorption of Bovine Serum Albumin to Gold Nanoparticle Surfaces. *Langmuir* 29, 14984–14996. <https://doi.org/10.1021/la402920f>
- Cieśla, M., Adamczyk, Z., Barbasz, J., Wasilewska, M., 2013. Mechanisms of Fibrinogen Adsorption at Solid Substrates at Lower pH. *Langmuir* 29, 7005–7016. <https://doi.org/10.1021/la4012789>
- Daniel, M. C., & Astruc, D. (2004). Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews*, 104(1), 293–346. <https://doi.org/10.1021/cr030698+>
- Deng, Z.J., Liang, M., Toth, I., Monteiro, M.J., Minchin, R.F., 2012. Molecular Interaction of Poly(acrylic acid) Gold Nanoparticles with Human Fibrinogen. *ACS Nano* 6, 8962–8969. <https://doi.org/10.1021/nn3029953>
- Du, Y., Jin, J., Liang, H., Jiang, W., 2019. Structural and Physicochemical Properties and Biocompatibility of Linear and Looped Polymer-Capped Gold Nanoparticles. *Langmuir* [acs.langmuir.9b00045](https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b00045). <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b00045>
- Erickson, H.P., 2009. Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. *Biol. Proced. Online* 11, 32–51. <https://doi.org/10.1007/s12575-009-9008-x>
- Gonçalves, S., Santos, N.C., Martins-Silva, J., Saldanha, C., 2007. Fluorescence spectroscopy evaluation of fibrinogen– β -estradiol binding. *J. Photochem. Photobiol. B* 86, 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2006.09.001>
- Lacerda, S.H.D.P., Park, J.J., Meuse, C., Pristiniski, D., Becker, M.L., Karim, A., Douglas, J.F., 2010. Interaction of Gold Nanoparticles with Common Human Blood Proteins. *ACS Nano* 4, 365–379. <https://doi.org/10.1021/nn9011187>
- Manning, G.S., 1978. The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides. *Q. Rev. Biophys.* 11, 179–246. <https://doi.org/10.1017/S0033583500002031>
- Mieszawska, A.J., Mulder, W.J.M., Fayad, Z.A., Cormode, D.P., 2013. Multifunctional Gold Nanoparticles for Diagnosis and Therapy of Disease. *Mol. Pharm.* 10, 831–847. <https://doi.org/10.1021/mp3005885>

- Moores, A., Goettmann, F., 2006. The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications. *New J. Chem.* 30, 1121. <https://doi.org/10.1039/b604038c>
- Nuzzo, R.G., Zegarski, B.R., Dubois, L.H., 1987. Fundamental Studies of the Chemisorption of Organosulfur Compounds on Au(111). Implications for Molecular Self-Assembly on Gold Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 733–740.
- Pallotta, A., Parent, M., Clarot, I., Luo, M., Borr, V., Dan, P., Decot, V., Menu, P., Safar, R., Joubert, O., Leroy, P., Boudier, A., 2017. Blood Compatibility of Multilayered Polyelectrolyte Films Containing Immobilized Gold Nanoparticles. Part. Part. Syst. Charact. 34, 1600184. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201600184>
- Pallotta, A., Philippe, V., Boudier, A., Leroy, P., Clarot, I., 2018. Highly sensitive and simple liquid chromatography assay with ion-pairing extraction and visible detection for quantification of gold from nanoparticles. *Talanta* 179, 307–311. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.11.016>
- Purohit, R., Vallabani, N.S., Shukla, R.K., Kumar, A., Singh, S., 2016. Effect of gold nanoparticle size and surface coating on human red blood cells. *Bioinspired Biomim. Nanobiomaterials* 5, 121–131. <https://doi.org/10.1680/jbibn.15.00018>
- Quach, Q.H., Kah, J.C.Y., 2017. Non-specific adsorption of complement proteins affects complement activation pathways of gold nanomaterials. *Nanotoxicology* 11, 382–394. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1306131>
- Reum, N., Fink-Straube, C., Klein, T., Hartmann, R.W., Lehr, C.-M., Schneider, M., 2010. Multilayer Coating of Gold Nanoparticles with Drug–Polymer Coadsorbates. *Langmuir* 26, 16901–16908. <https://doi.org/10.1021/la103109b>
- Ross, P.D., Subramanian, S., 1981. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry* 20, 3096–3102. <https://doi.org/10.1021/bi00514a017>
- Roux, S., Garcia, B., Bridot, J.-L., Salomé, M., Marquette, C., Lemelle, L., Gillet, P., Blum, L., Perriat, P., Tillement, O., 2005. Synthesis, Characterization of Dihydrolipoic Acid Capped Gold Nanoparticles, and Functionalization by the Electroluminescent Luminol. *Langmuir* 21, 2526–2536. <https://doi.org/10.1021/la048082i>
- Semmler-Behnke, M., Kreyling, W.G., Lipka, J., Fertsch, S., Wenk, A., Takenaka, S., Schmid, G., Brandau, W., 2008. Biodistribution of 1.4- and 18-nm gold particles in rats. *Small*, 4, 2108–2111. <https://doi.org/10.1002/smll.200800922>
- Shemetov, A.A., Nabiev, I., Sukhanova, A., 2012. Molecular Interaction of Proteins and Peptides with Nanoparticles. *ACS Nano* 6, 4585–4602. <https://doi.org/10.1021/nn300415x>
- Sotnikov, D.V., Berlina, A.N., Ivanov, V.S., Zherdev, A.V., Dzantiev, B.B., 2019. Adsorption of proteins on gold nanoparticles: One or more layers? *Colloids Surf. B Biointerfaces* 173, 557–563. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.025>
- Swathi, R.S., Sebastian, K.L., 2009. Distance dependence of fluorescence resonance energy transfer. *J. Chem. Sci.* 121, 777–787. <https://doi.org/10.1007/s12039-009-0092-x>
- Tournebize, J., Boudier, A., Sapin-Minet, A., Maincent, P., Leroy, P., Schneider, R., 2012. Role of Gold Nanoparticles Capping Density on Stability and Surface Reactivity to Design Drug Delivery Platforms. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 4, 5790–5799. <https://doi.org/10.1021/am3012752>

- Vroman, L., 1962. Effect of absorbed proteins on the wettability of hydrophilic and hydrophobic solids. *Nature* 196, 476–477. <https://doi.org/10.1038/196476a0>
- Wang, G., Yan, C., Gao, S., Liu, Y., 2019. Surface chemistry of gold nanoparticles determines interactions with bovine serum albumin. *Mater. Sci. Eng. C* 103, 109856. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109856>
- Wang, P., Wang, X., Wang, L., Hou, X., Liu, W., Chen, C., 2015. Interaction of gold nanoparticles with proteins and cells. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 16, 034610. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/3/034610>
- Wang, W., Wei, Q.-Q., Wang, J., Wang, B.-C., Zhang, S., Yuan, Z., 2013. Role of thiol-containing polyethylene glycol (thiol-PEG) in the modification process of gold nanoparticles (AuNPs): Stabilizer or coagulant? *J. Colloid Interface Sci.* 404, 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.04.020>
- Xiao, W., Xiong, J., Zhang, S., Xiong, Y., Zhang, H., Gao, H., 2018. Influence of ligands property and particle size of gold nanoparticles on the protein adsorption and corresponding targeting ability. *Int. J. Pharm.* 538, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.01.011>
- Xie, X., Liao, J., Shao, X., Li, Q., Lin, Y., 2017. The Effect of shape on Cellular Uptake of Gold Nanoparticles in the forms of Stars, Rods, and Triangles. *Sci. Rep.* 7, 3827. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04229-z>
- Zhang, G., Yang, Z., Lu, W., Zhang, R., Huang, Q., Tian, M., Li, L., Liang D., Li, C., 2009. Influence of anchoring ligands and particle size on the colloidal stability and in vivo biodistribution of polyethylene glycol-coated gold nanoparticles in tumor-xenografted mice. *Biomaterials* 30, 1928–1936. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.038>
- Zhang, S., Moustafa, Y., Huo, Q., 2014. Different Interaction Modes of Biomolecules with Citrate-Capped Gold Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6, 21184–21192. <https://doi.org/10.1021/am506112u>
- Zopes, D., Stein, B., Mathur, S., Graf, C., 2013. Improved Stability of “Naked” Gold Nanoparticles Enabled by in Situ Coating with Mono and Multivalent Thiol PEG Ligands. *Langmuir* 29, 11217–11226. <https://doi.org/10.1021/la4012058>

Conclusion de l'article 3 :

Au travers de ces travaux, nous avons défini les caractéristiques d'un ligand de surface permettant d'obtenir des AuNP présentant une forte hémocompatibilité. Celui-ci doit être lié par une interaction de forte énergie au cœur d'or et conférer charge négative aux AuNP. Cet article a aussi mis en lumière un fait encore non décrit dans la littérature en prouvant que l'hémolyse l'induite par les AuNP peut être modulée par la formation de la couronne protéique autour d'elles. Enfin dans le contexte global de ce projet de thèse, cet article a permis de créer un modèle d'étude dont les méthodes et les conclusions sont en partie transférables à l'étude de la biocompatibilité de surfaces nanostructures. En effet, il révèle que l'étude de l'adhésion protéique est un point clé à maîtriser en termes de biocompatibilité. Sur une surface, la formation de la couche initiale de protéines est connue pour entraîner de nombreux processus délétères tels que l'hémolyse, l'inflammation et la coagulation. Ainsi ces aspects d'optimisation de la biocompatibilité à l'échelle d'une surface feront l'objet d'une discussion développée dans la partie suivante.

3.2 Biocompatibilité des films multicouches immobilisant des AuNP

3.2.1 Introduction

La biocompatibilité s'appuie sur la norme ISO-10993-1 : 2018 « évaluation biologique des dispositifs médicaux »⁴⁶. Elle stipule que la biocompatibilité est « la capacité d'un dispositif médical ou d'un matériau à fonctionner avec une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique ». Dans le cadre de ce projet, la finalité étant l'optimisation des propriétés de surface d'un dispositif médical cardiovasculaire, la surface créée doit répondre à plusieurs exigences. Premièrement, la surface ne doit pas favoriser l'adsorption des protéines présentes dans la circulation sanguine. Cet événement est souvent le point de départ de nombreux phénomènes délétères tels que l'activation de la cascade de la coagulation⁴⁷ ou encore l'apparition de phénomènes pro-inflammatoires⁷⁵. Dans un second temps, cette surface ne doit pas induire de dommages aux cellules circulantes (érythrocytes principalement) et aux cellules constituant les vaisseaux sanguins (cellules endothéliales). Enfin, elle ne doit pas promouvoir l'adhésion et l'activation des thrombocytes et leucocytes.

Dans ce contexte, la modulation de l'adhésion protéique représente un point clé du design d'une surface biocompatible vis-à-vis du compartiment sanguin. L'adsorption d'albumine sur une surface polymérique a longtemps été considérée comme un phénomène favorable pouvant même limiter l'adhésion plaquettaire sur celle-ci. Cependant, des études plus récentes viennent nuancer ce constat. La conformation adoptée par l'albumine lors de son adsorption peut promouvoir le recrutement et l'adhésion des thrombocytes⁷⁶ ou des macrophages⁷⁷. De plus, sur les surfaces hydrophiles où l'albumine est liée *via* des interactions de faible énergie, un phénomène dynamique visant à la remplacer par d'autres protéines peut être observé. Cet aspect répond à un phénomène décrit dans la littérature comme étant l'effet Vroman⁷⁸. Cette théorie précise que sur une surface au contact de la circulation sanguine, des protéines peu spécifiques

présentes en forte concentration (albumine et fibrinogène typiquement) seront absorbées prioritairement. Puis dans un second temps, la composition de cette couche initiale de protéines évoluera vers la formation d'une couche hétérogène *via* l'adsorption de protéines plus minoritaires mais de plus forte affinité pour la surface. C'est cette phase d'adsorption séquentielle qui peut conduire à la formation d'une interface intégrant des protéines plus spécialisées telles que celles de la voie intrinsèque de la coagulation ⁴¹. *In fine*, l'adsorption protéique peut induire une activité pro-coagulante ou pro-inflammatoire en favorisant le recrutement des effecteurs cellulaires impliqués dans ces phénomènes (thrombocytes ⁴² et leucocytes ⁴⁴).

Des travaux précédemment menés au sein du laboratoire CITHEFOR se sont intéressés à étudier l'influence de la dernière couche déposée du film (PAH, AuNP, ou PAA) sur l'interaction avec des protéines modèles (albumine et fibrinogène) et avec les GR (étude de l'hémolyse induite) ¹⁰. Ces résultats démontrent que l'utilisation en multicouches du polyanion PAA en tant que dernière couche déposée permet de générer un film sur une surface qui présente la meilleure hémocompatibilité.

En parallèle, l'article présenté au début de ce chapitre a fait état de l'étude de la biocompatibilité des nanoparticules d'or colloïdales. Il a démontré que l'utilisation de PEG ou de DHLA comme ligand de surface favorisait la biocompatibilité.

L'objet de cette partie est de poursuivre l'étude de la biocompatibilité des films multicouches vis-à-vis du compartiment sanguin en liant les deux informations précédentes.

Nous avons donc émis l'hypothèse que la mise en place d'un film multicouches avec l'ajout d'une dernière couche constituée d'un copolymère de PAA « pégylé », c'est-à-dire fonctionnalisé avec un polymère de type PEG, permettrait d'améliorer la biocompatibilité de ces matériaux comme schématisé par la figure 14. La pégylation permet la création d'une

surface hydrophile ⁷⁹ présentant un fort encombrement stérique ⁸⁰ ce qui ainsi devrait limiter l'adhésion protéique ⁸¹.

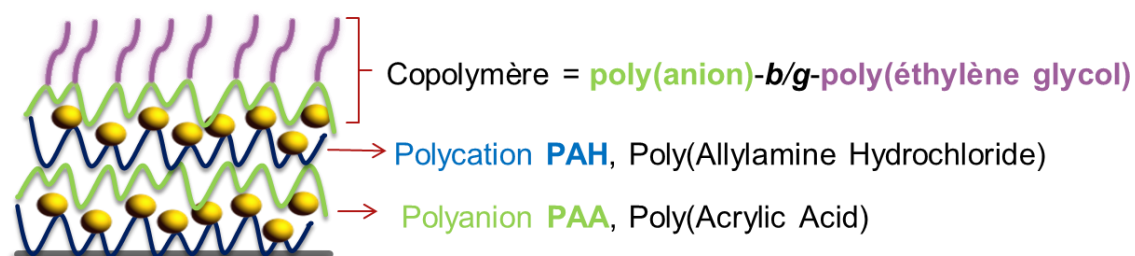
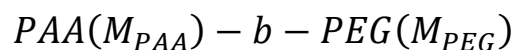


Figure 14 : Schéma représentant l'organisation des films multicouches avec une dernière couche de copolymère à blocs (-b-) ou greffé (-g-) PAA-b/g-PEG.

La pégylation des différents films est réalisée par l'ajout d'une dernière couche de copolymère PAA-b/g-PEG. Quatre copolymères commerciaux ont été étudiés, deux organisés en blocs et deux de types greffés dont les structures et caractéristiques sont présentées dans la figure 15 et les tableaux 4 et 5 respectivement. Les copolymères utilisés au cours de cette étude répondent aux notations suivantes :



Avec :

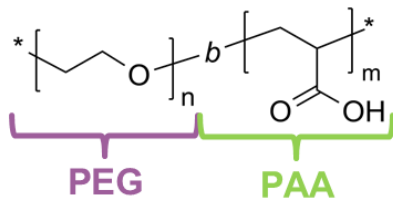
M_{PAA} la masse molaire relative de la chaîne principale PAA (en 10^3 g. mol^{-1})

M_{PEG} la masse molaire relative de la chaîne PEG (en 10^3 g. mol^{-1})

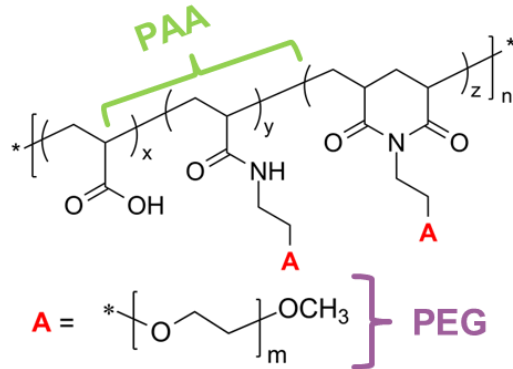
-b- ou -g- l'organisation copolymère à blocs ou greffé

$[f_{PEG}]$ la fréquence d'apparition du motif PEG sur les copolymères greffés,

A Bloc : PAA-*b*-PEG



B Greffé : PAA-*g*-PEG



Représentation schématique des copolymères :



Figure 15 : Structure des copolymères PAA-*b/g*-PEG utilisées dans cette étude. A. Copolymère à blocs PAA-*b*-PEG formé par la liaison d'une chaîne PEG à l'extrémité du polymère principal PAA. B. Copolymère greffé PAA-*g*-PEG formé par l'addition de plusieurs chaînes PEG sur les groupements acides carboxyliques du polymère principal PAA.

Sur le copolymère à blocs, la chaîne PEG est liée à une extrémité du polymère principal PAA. Les deux copolymères à blocs étudiés ici diffèrent selon la longueur de leur chaîne PEG, une courte de masse molaire 3 800 g.mol⁻¹ et une longue de 14 000 g.mol⁻¹ pour une chaîne PAA quasi équivalente soit les notations suivantes : PAA(13,5)-*b*-PEG(3,8) et PAA(12,5)-*b*-PEG(14), respectivement. Les copolymères greffés sont caractérisés par l'ajout de plusieurs chaînes PEG *via* des liaisons amides ou imides sur les fonctions acides carboxyliques du squelette PAA. Il en résulte en une organisation dite en peigne. Les deux copolymères greffés envisagés ici sont formés de PAA et PEG de même masse molaire (5 000 et 2 000 g.mol⁻¹, respectivement). Leur différence repose sur la fréquence d'apparition du motif PEG, l'un est à faible ratio de greffage (en moyenne 1 PEG pour 7 monomères d'acide acrylique, PAA(5)-

$g[0,14]$ -PEG(2)), l'autre à fort taux de greffage (en moyenne 1 PEG pour 3,5 monomères d'acide acrylique, PAA(5)- $g[0,28]$ -PEG(2)). Les masses molaires relatives totales des deux copolymères greffés sont de 25 000 et 45 000, respectivement.

L'objectif ici est de sélectionner l'architecture (bloc ou greffé) et les caractéristiques (longueur de chaîne ou fréquence d'apparition) offrant la meilleure biocompatibilité.

Tableau 4 : Copolymère à bloc PAA-*b*-PEG utilisé dans cette étude (fournis par Polymer Source, Canada).

Organisation	Identification	Terminaison des chaînes PEG
Bloc	PAA(13,5)- <i>b</i> - PEG(3,8)	O-CH ₃
	PAA(12,5)- <i>b</i> - PEG(14)	

Tableau 5 : Copolymère greffé PAA-*g*-PEG utilisé dans cette étude (fournis par Polymer Source, Canada).

Organisation	Identification	Fréquence d'apparition du PEG	Nombre total de chaînes PEG	Masse molaire relative totale	Terminaison chaînes PEG
Greffé	PAA(5)- <i>g</i> [0,14]- PEG(2)	$f_{\text{PEG}} = 0,14$ 1 PEG pour 7 monomères d'Acide acrylique	10	25000	O-CH ₃
	PAA(5)- <i>g</i> [0,28]- PEG(2)	$f_{\text{PEG}} = 0,28$ 1 PEG pour 3,5 monomères d'Acide acrylique	20	45000	

3.2.2 Matériel & Méthode

3.2.2.1 Préparation des films multicouches

Les films multicouches étudiés pour les expérimentations de ce chapitre sont construits sur des lamelles en verre de 12 mm de diamètre (Menzel Glaser) et caractérisés selon les méthodes décrites dans l'article 2⁸². Ces substrats sont utilisés après avoir effectué une procédure de nettoyage stricte : trempage dans un tensio-actif basique (Hellmanex 2%) à 50°C dans un bain à ultrasons pendant 15 min, suivi d'un rinçage abondant à l'eau purifiée. Ils sont ensuite immergés dans une solution de HCl 1 M à 50°C dans un bain à ultrasons pendant 15 min, puis abondamment rincés à l'eau déionisée ultrapure (>18,2 MΩ/cm) et enfin séchés à température ambiante. Les solutions de polyélectrolytes (0,1 M en tampon Tris-NaCl (pH= 7,4 ; 0,01M-0,15M) selon les masses moléculaires des monomères) sont préparées fraîchement avant chaque expérience. La construction des films multicouches est réalisée comme suit. Une lamelle est plongée dans la solution de polycation PAH pendant 10 min, puis rincée avec le tampon pendant 3 min. Ensuite, la lamelle est immergée dans la suspension d'AuNP pendant 10 min, rincée comme décrit précédemment, plongée dans la solution PAA pendant 10 min et rincée. Dans cette étude, une couche est définie comme le produit du dépôt de polycation, d'AuNP ou de polyanion, et un cycle est le dépôt consécutif de ces 3 différents réactifs (PAH, AuNP puis PAA). Ici, les films multicouches sont formés par une répétition de ces cycles (un cycle étant [PAH-AuNP-PAA]), lors du dernier dépôt le PAA est remplacé par un copolymère PAA-*b/g*-PEG (0.1 M en tampon Tris-NaCl, pH = 7,4) pour obtenir une dernière couche pégylée.

3.2.2.2 Caractérisation des films multicouches et étude de l'adsorption protéique par Microbalance à Cristal de Quartz (QCM).

Cette méthode est basée sur les propriétés piézo-électriques du quartz. L'application d'un champ électrique au quartz fait vibrer le cristal dans un mode de résonance mécanique. La variation de cette fréquence de résonance est proportionnelle à l'épaisseur et à la densité de masse déposée en surface du cristal. La construction des films multicouches à la surface des cristaux de quartz est réalisée selon la méthode à 3 cycles de construction sur substrat en verre telle que décrite précédemment. Cette construction sur les cristaux est schématisée par la figure 16

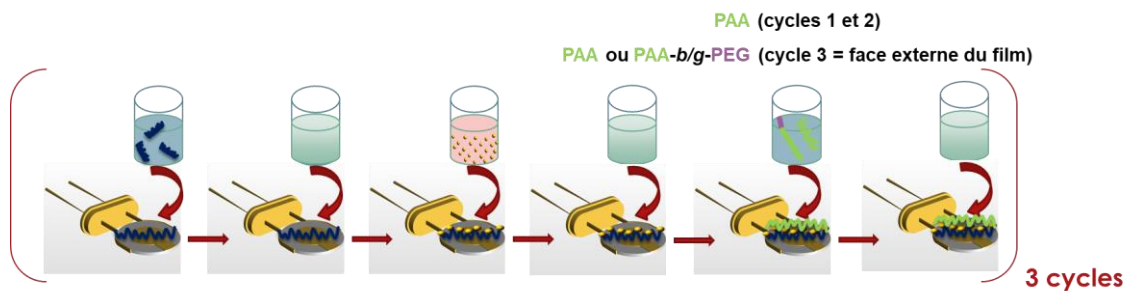


Figure 16 : Schématisation de la préparation des films multicouches pégylés à la surface d'un cristal de quartz de QCM.

Les mesures QCM sont effectuées avec un instrument E1 QCM-D (Q-Sense, Suède) à une température de 21 °C et des cristaux de quartz recouverts d'or (50 nm, fréquence de résonance de 5 MHz) de Q-Sense sont utilisés. Les cristaux sont d'abord nettoyés à l'aide d'un nettoyeur à plasma (PDC-32G-2 Harris Plasma, Etats-Unis) pendant 15 min. Ensuite, les films multicouches sont assemblés à l'intérieur de la chambre QCM. Pour chaque cycle de dépôt de couche, 500 μL de solution de polycation (PAH), de solution d'AuNPs ou de solution de PAA (\pm PEG) sont introduits dans la chambre (avec un débit de 250 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) jusqu'à ce que des valeurs de fréquences stables soient atteintes. Chaque couche déposée est ensuite rincée avec le tampon Tris-NaCl (0,01 M-0,15 M). Le cristal est excité à sa fréquence fondamentale (environ 5 MHz), et l'observation a lieu à la troisième harmonique (v_3). La quantité de PEG

déposée lors de l'ajout des différents copolymère PAA-*b/g*-PEG est déterminée à partir de la variation de fréquence enregistrée pour la troisième harmonique (voir ci-après).

L'étude de l'adsorption protéique est réalisée sur les films à la fin de leur construction. Une solution d'albumine 0,4 g/L en tampon PBS (pH= 7,4 ; 0,15 M) et du sérum de veau fœtal à 10 % (concentration finale) dilué en tampon PBS ont été utilisés. Avant injection de la matrice protéique dans la chambre de mesure, les films sont rincés par 500 µL de tampon PBS. Ce rinçage préalable permet de s'affranchir d'une variation de fréquence, qui serait uniquement due au changement de tampon entre la phase de construction du film (Tris-NaCl) et la phase d'adsorption protéique (PBS). Puis, 500 µL d'échantillon protéique sont mis en contact avec les films. Enfin, un rinçage par le tampon PBS est réalisé. Cette étape de rinçage final permet d'estimer qualitativement la force de l'interaction entre les protéines éventuellement adsorbées et les films. En effet, de fortes quantités de protéines désorbées par cette étape de rinçage signifient que l'interaction des protéines avec le film est faible.

Les densités de masses déposées de PEG ou de protéines à la surface des films Δm sont calculées selon l'équation de Sauerbrey⁸³. Il s'agit d'une première approximation qui suppose que les propriétés mécaniques du dépôt sont identiques à celles d'un film fin et rigide, uniforme et adhérent au cristal. La relation suivante est applicable ici :

$$\Delta m = \frac{-C \Delta f_{\nu}}{\nu}$$

Avec C la constante caractéristique du quartz utilisé (-17,7 ng.cm⁻².Hz⁻¹) et avec $\Delta f/\nu$ correspondant aux variations de fréquences enregistrées pour chaque harmonique ν . L'harmonique $\nu=3$ a été considérée, celle-ci permettant d'obtenir le signal le moins bruité en général.

3.2.2.3 Hémolysé induite

3.2.2.3.1 Quantification de l'hémoglobine

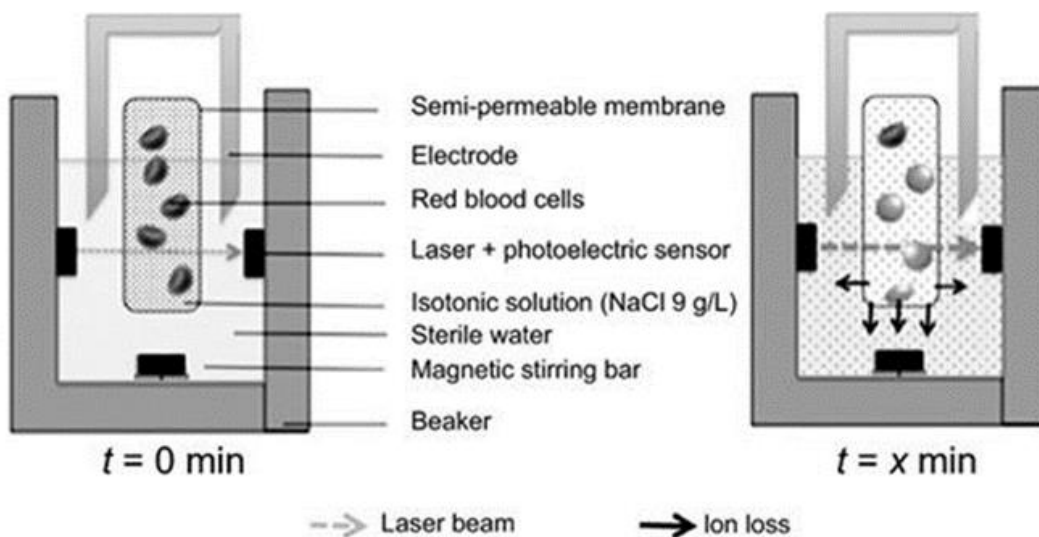
La capacité des films multicouches à induire une hémolysé a été adaptée d'une méthode précédemment décrite en utilisant du sang de mouton défibriné¹⁰. Le lavage des GR a été effectué 3 fois en diluant le sang au dixième en PBS et en resuspendant le culot cellulaire en PBS après centrifugation (5 min, 700 rcf, 4 °C). Une solution de travail contenant $2,5 \times 10^6$ GR/mL a été préparée par dilution du sang lavé avec du PBS. Le contrôle positif correspond à une suspension de GR de même concentration dans laquelle le PBS est remplacé par de l'eau ultrapure lors du dernier lavage pour forcer la libération d'hémoglobine par lyse hypotonique. Les échantillons ont été préparés en triplicata en immergeant les matériaux dans la solution de travail à $2,5 \times 10^6$ GR/mL puis incubés dans une étuve à 37 °C pendant 3h. Plusieurs contrôles ont été élaborés : le contrôle positif correspond au sang dilué dans l'eau ultrapure, le contrôle négatif est le sang dilué en PBS incubé sans matériau. De plus, l'influence du substrat de base a été estimé en incubant une lamelle de verre nue et enfin, le dernier témoin est un film multicouche non « pégylé » dont la dernière couche est uniquement du PAA. La cinétique d'hémolysé a été déterminée en mesurant toutes les 30 min l'absorbance d'une fraction de sang incubée avec les matériaux en suivant l'absorbance à $\lambda = 540$ nm après centrifugation (5 min, 700 rcf, 4°C). L'hémolysé induite pour les différentes conditions a été exprimée en pourcentage de l'hémolysé constatée avec le contrôle positif.

3.2.2.3.2 Test de fragilité membranaire

La fragilité membranaire des GR après contact avec la surface a été étudiée à partir d'un pool d'érythrocytes constitué avec le sang de 5 donateurs volontaires humains. Cette méthode a été utilisée en complément de la cinétique d'hémolysé par quantification de l'hémoglobine. Ainsi, les mêmes surfaces et contrôles ont été étudiés selon les mêmes conditions. Le principe de cette mesure est détaillé par la figure 17 A. Après incubation avec les matériaux (3h à 37°C) la

solution de GR dilués dans une solution isotonique (NaCl à 9,0 g/L) est placée dans une membrane semi-perméable, elle-même immergée dans une enceinte contenant de l'eau ultrapure ⁸⁴. L'osmolarité de la solution d'incubation est modifiée par la diffusion des ions sodium et chlorure vers l'eau ultrapure à l'extérieur de la membrane. La variation de la concentration en NaCl est déterminée par une électrode mesurant la conductance du milieu d'analyse. En parallèle, un laser permet de mesurer la variation de la transmittance de la solution (Figure 17 B). Une augmentation de la transmittance est le signe de la lyse des GR par hypotonie. L'expression de la variation de la transmittance en fonction de la concentration en NaCl permet de définir 3 points d'hémolyse. L'hémolyse initiale correspond au point d'inflexion de cette courbe. Il s'agit de la concentration en NaCl capable d'induire la lyse des GR les plus fragiles. Le point milieu de cette sigmoïde donne le point d'hémolyse maximale soit la concentration en NaCl à partir de laquelle la majorité des GR sont détruits. Enfin le début d'un plateau représente le point d'hémolyse de la totalité des GR présents dans l'échantillon.

A



B

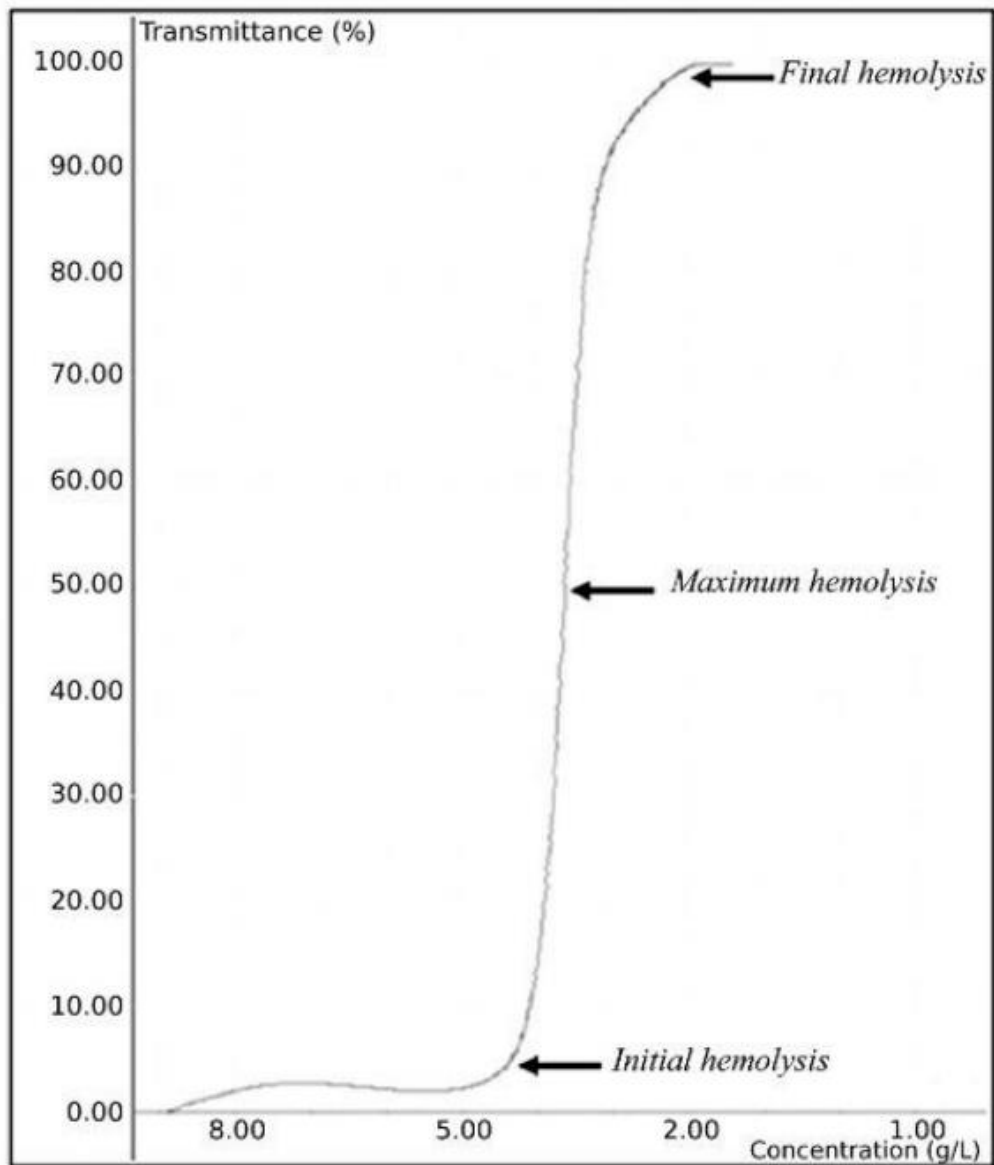


Figure 17 : A Principe de la mesure de fragilité membranaire par la méthode Osmocell® B Courbe représentative de la variation de la transmittance en fonction de la concentration en NaCl de la solution d'incubation de GR. (Reproduits depuis les travaux de Gérard et al 2017)

84

3.2.2.4 Etude de la cinétique d'activation de la thrombine.

L'étude de la cinétique d'activation de la thrombine repose sur une méthode décrite dans la littérature ⁸⁵. Elle est réalisée à partir de plasma pauvre en plaquettes (PPP) prélevé sur des tubes avec comme anti-coagulant le citrate de sodium et issu de donneurs humains volontaires incubé au contact des différentes surfaces pendant 3h à 37 °C. Puis l'activation de la thrombine après incubation a été étudiée en mesurant sa capacité à cliver un substrat portant un fluorogène. La libération du composé fluorescent est quantifiée par spectrofluorimétrie à une longueur d'excitation de 390 nm et une longueur d'onde d'émission de 460 nm. L'activité enzymatique de la thrombine est initiée par l'ajout de ses cofacteurs (facteur tissulaire à 5 pM ou 1 pM selon l'expérience et phospholipides négatifs). L'enregistrement du travail enzymatique de la thrombine permet d'établir un thrombinogramme (Figure 18) à partir duquel 3 paramètres sont déterminés, le temps d'apparition (temps de latence) et l'intensité (hauteur du pic) de la réponse et l'air sous la courbe représentant le travail enzymatique de la thrombine

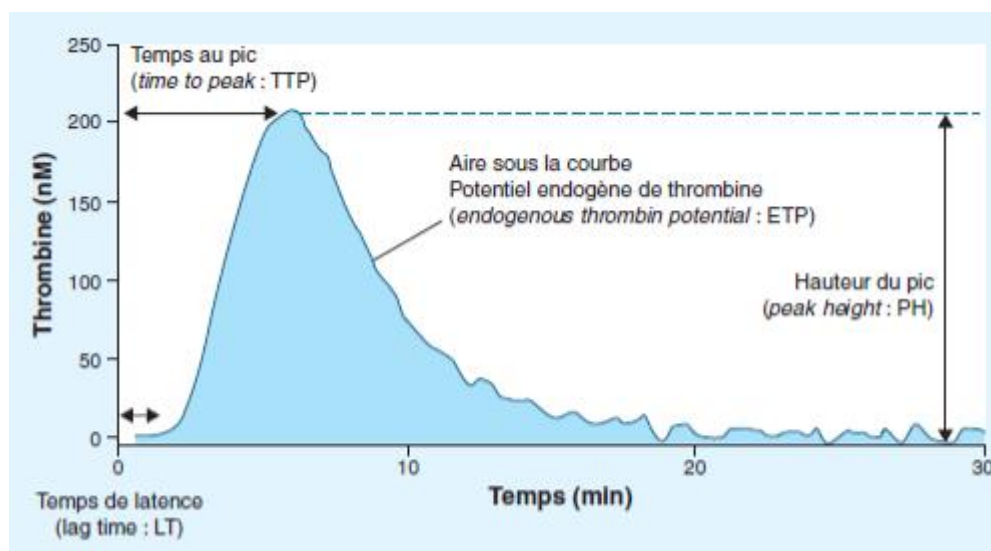


Figure 18 : Exemple de thrombinogramme enregistré lors de l'étude la cinétique d'activation de la thrombine (reproduit depuis l'article de Lecut et al 2015) ⁸⁶.

3.2.2.5 Etude de l'activité métabolique de fibroblastes murins au contact des surfaces

L'étude de la cytotoxicité a été réalisée par la mesure de l'activité métabolique de fibroblastes murin (NIH3T3) cultivés en milieu DMEM « high glucose » supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal et 1 % d'antibiotiques (pénicille/ streptomycine) afin d'éviter une éventuelle contamination bactérienne. Les films construits sur des lamelles en verre ont été stérilisés par 3 rinçages successifs d'éthanol 70% puis de tampon Tris-NaCl (pH = 7,4 ; 0,01M-0,15M). Avant encensement, chaque surface a été placée dans un puits d'une microplaque 24 puits et stérilisée 30 min sous lumière Ultra Violet (U.V.). L'étude de viabilité est réalisée à partir d'une culture de fibroblaste (NIH3T3) à passage 23. A J0, chaque surface (d'une aire de 1,14 cm²) et contrôle sontensemencés avec 1 mL de suspension cellulaire de concentration à 10⁴ cellules/mL puis incubés dans une étuve thermostatée à 37 °C avec 5% de CO₂. L'activité métabolique des différentes conditions de culture a été mesurée par la méthode à l'Alamar Blue⁸⁷ (Promokine ®) à J1, J3 et J7. Brièvement, le milieu de culture de chaque condition a été remplacé, après un rinçage avec du tampon PBS, par 1 mL d'une solution de rezaurine (réactif d'Alamar Blue) diluée au dixième en milieu de culture complet. Après 2 h d'incubation à 37 °C, 100 µL de chaque condition sont transférés en plaques noires de 96 puits. La mesure de la fluorescence a été réalisée à l'aide d'un spectrofluorimètre paramétré avec une longueur d'onde d'excitation de 570 nm et une longueur d'onde d'émission à 585 nm avec une largeur de fentes de ± 5 nm et une tension de 600 V appliquée au photomultiplicateur. L'activité métabolique cellulaire de chaque condition est proportionnelle à l'intensité de fluorescence mesurée. L'influence des différentes constructions testées sur la viabilité cellulaire est estimée par comparaison avec l'activité métabolique mesurée sur le substrat de référence (lamelle de verre).

3.2.2.6 Quantification de l'or libéré par les film multicouches immobilisant des AuNP

L'étude de libération d'or par les films multicouches immobilisant des AuNP est déterminée en incubant les différents films pégylés ou non dans 1 mL de milieu de culture des cellules endothéliales (composition décrite ci-après) pendant 24h à 37°C. La quantification d'or libérée est effectuée sur ce surnageant. Le pourcentage d'or retrouvé dans le milieu de culture cellulaire est déterminé par comparaison avec la quantité d'or contenue dans un film multicouche construit de la même façon mais n'ayant pas été incubé. La quantification de l'or libéré repose sur une méthode de chromatographie liquide précédemment développée⁸⁸. Brièvement, les lamelles de verre recouvertes ont été finement broyées à l'aide d'un mortier et d'un pilon, transférées dans un tube Eppendorf® LoBind puis mélangées avec une solution oxydante (400 µL de solution de HCl-NaCl-Br₂ 1,0 M-0,3 M-0,025 M, respectivement) pendant 20 min. Pour la quantification dans le milieu de culture cellulaire, une fraction du surnageant a été mélangée avec cette même solution oxydante. Ces mélanges ont ensuite été partiellement évaporés à l'aide d'un Turbovap (Biotage) à 40 °C sous gaz inerte (N₂, 4 psi) pendant 20 min. Ensuite, 200 µL de solution de NH₄Cl (30% m/V), 100 µL de HCl 6 M et 100 µL de solution de rhodamine B (0,084 µM) ont été ajoutés. La paire d'ions formée entre l'anion tétraurochlorate et la rhodamine B a été extraite par 200 µL d'éther diisopropylique. Les tubes ont été agités sur un agitateur Vibramax 100 (Heidolf Instruments) pendant 3 min à 1500 rpm puis centrifugé (Mini Spin Plus, Eppendorf) pendant 3 min à 12100 × g. Ensuite, 150 µL du surnageant (phase organique) ont été prélevés et complètement évaporés (Turbovap, 5 min, N₂, 3 psi), et le résidu séché a été dissous dans la phase mobile (150 µL) avant d'être injecté dans le système HPLC. Les analyses HPLC ont été réalisées sur un instrument SpectraSystem composé d'une pompe quaternaire (P1000XP), d'un passeur automatique d'échantillons (AS300) et d'un détecteur UV-Visible (UV2000). La colonne (Nucleosil® C18, 150 mm × 4.6 mm, granulométrie de 3 µm et porosité de 100 Å) a été thermostatée à 40 °C à l'aide d'un four Croco-cil (1267). L'acquisition des

données et le contrôle de l'injection ont été effectués par le logiciel Azur (version 5.0, Datalys®). La phase mobile était constituée d'un mélange d'acétonitrile et d'eau (25/75, V/V) contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique. Le volume d'injection était de 20 µL. Le détecteur était réglé à 555 nm et la pompe était réglée à un débit de 1,0 mL.min⁻¹. La quantification de l'or dans le milieu de culture cellulaire a été réalisée à l'aide d'une gamme d'étalonnage de concentration en or (AuCl₄⁻) connue préparée dans le milieu de culture cellulaire.

3.2.2.7 Culture et étude de la viabilité des cellules endothéliales HUVEC.

Les études sur cellules endothéliales humaines primaires sont réalisées à partir d'HUVEC provenant d'un donneur unique (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) obtenues auprès du fournisseur Promocell (référence : C-12200). Ces cellules adhérentes sont cultivées en flasques T 175 pour maximiser la quantité de cellules avec le milieu Endothelial Cell Growth Medium MV (Promocell) et repiquées avant confluence selon les recommandations du fournisseur à l'aide d'un kit de détachement (detachkit, Promocell). Brièvement, la culture est rincée par le tampon HEPES, les cellules sont détachées à l'aide de trypsine à température ambiante et enfin l'action de celle-ci est stoppée par une solution de neutralisation. Toutes les expérimentations présentées dans cette partie sont réalisées à partir de cultures cellulaires à faible passage (< 8).

Les mesures de viabilité cellulaire ont été réalisées selon la méthode à l'Alamar Blue précédemment décrite sur des surfaces stérilisées par traitement chimique (éthanol) et physique (U.V.). Le *S*-nitrosoglutathion (GSNO) utilisé dans cette étude a été synthétisé juste avant usage selon une méthode du laboratoire ⁸⁹. Il est obtenu à partir d'une réaction équimolaire entre glutathion réduit et les ions nitrite en condition acide (HCl 1 M). Après une heure de réaction le pH de cette solution est neutralisé par l'ajout d'hydroxyde de sodium et par dilution en tampon phosphate (0,25M, pH = 7,4).

3.2.3 Résultats et discussion

3.2.3.1 Caractérisation des surfaces pégylées

La caractérisation des films multicouches pégylés et les essais d'adsorption protéique ont été réalisés par QCM. Cette méthode est particulièrement bien adaptée à l'étude des films multicouches. En effet, elle permet de visualiser l'adsorption et / ou la désorption de chaque couche constituant le film.

Dans un premier temps, il a été vérifié si l'utilisation d'un copolymère aboutissait effectivement à un dépôt de celui-ci en surface du film. La figure 19 apporte un exemple de résultat de cette étape de caractérisation.

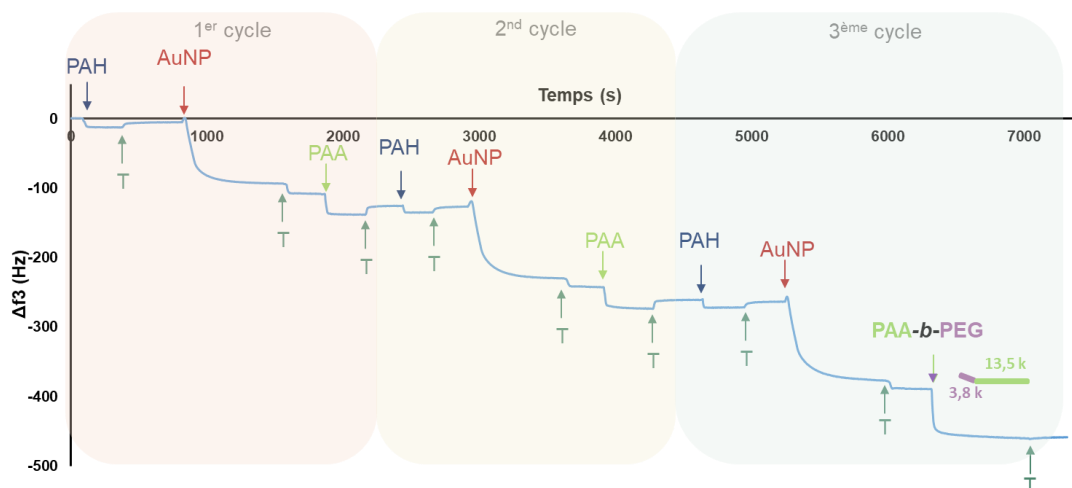


Figure 19: Exemple de caractérisation de la construction des films multicouches « pégylés » par QCM en enregistrant la variation de la fréquence de la troisième harmonique en fonction du temps. Un volume de 500 μL de chaque réactif a été injecté dans le système thermostaté à 21 $^{\circ}\text{C}$ selon un débit de 250 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Les polymères (PAH, PAA et PAA-b-PEG) étaient préparés à 0,1 M en tampon Tris-NaCl (pH = 7,4 ; 0,01 M – 0,15 M). Chaque dépôt est suivi par un rinçage (T) par le tampon Tris- NaCl (pH = 7,4 ; 0,01 M – 0,15 M).

La diminution de la variation de fréquence enregistrée à chaque étape de construction du film confirme le dépôt des différentes couches constituant le film. Ici, l'exemple sélectionné correspond à la « pégylation » d'un film par le copolymère à blocs à courte chaîne PEG, le PAA (13,5) -b-PEG (3,8). Pour ce copolymère, on observe, à l'image des autres couches, une

variation de fréquence non modifiée après rinçage par le tampon donc sans désorption du copolymère ou du film après dépôt. Cette expérimentation a été menée en triplicats pour chaque copolymère PAA-*b/g*-PEG dans le but déterminer la quantité de PEG déposée en surface des films et leur stabilité après rinçage. La figure 20 présente l'exploitation numérique des variations de fréquences enregistrées en QCM lors de la construction des films pégylés.

On remarque que l'utilisation d'une dernière couche de copolymère greffé permet d'ajouter une densité de masse de PEG en surface des films multicouches 2 à 6 fois supérieure à celle apportée par l'utilisation d'un copolymère à blocs. Cette observation peut s'expliquer par le fait que la fraction de PEG des copolymères à fort et faible taux de greffage représente respectivement 90 et 80 % de leur masse totale. Cependant, les variations de la densité de masse déposée entre plusieurs expériences est importante, l'écart-type est de l'ordre de 60 % de la valeur moyenne de 3 expériences similaires. Il témoigne du manque de reproductibilité dans la construction de ces films. La structure de ce copolymère peut être l'explication. En effet, les copolymères greffés sont obtenus *via* la formation d'une liaison amide ou imide entre la partie PEG et les fonctions carboxyliques du squelette PAA. De ce fait une partie des groupements assurant l'ancrage, par interaction électrostatique, de ce copolymère au sein du film n'est plus disponible (environ 30 %). Une variation importante de la fréquence après rinçage serait le signe d'une désorption du copolymère induite par le tampon mais dans cette partie de l'étude, ceci n'est pas observé.

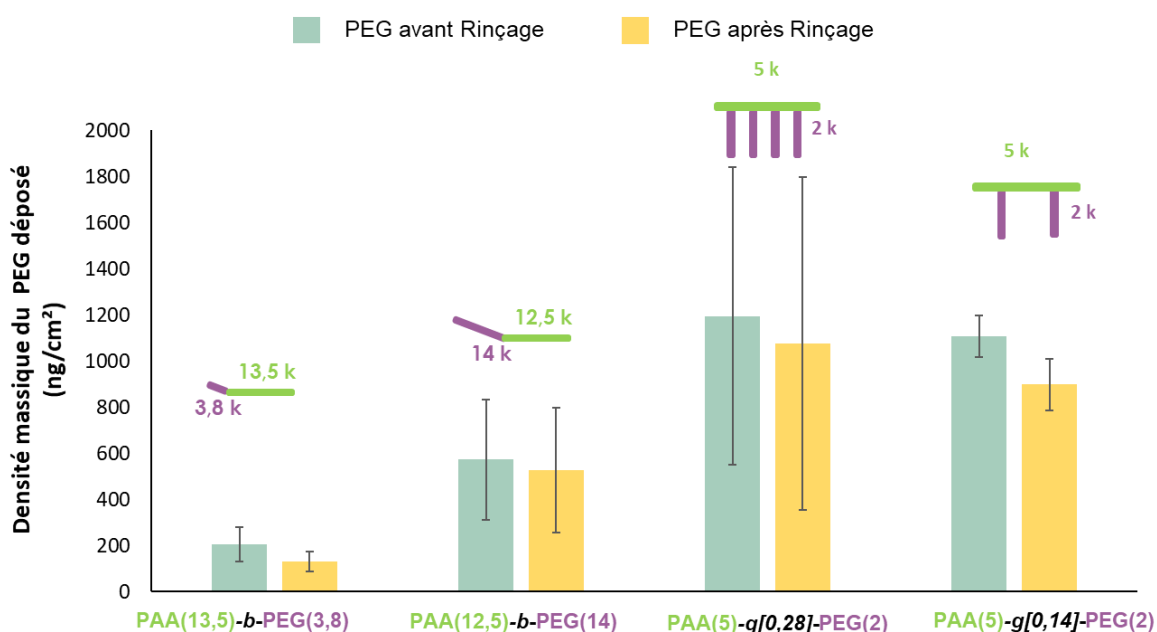
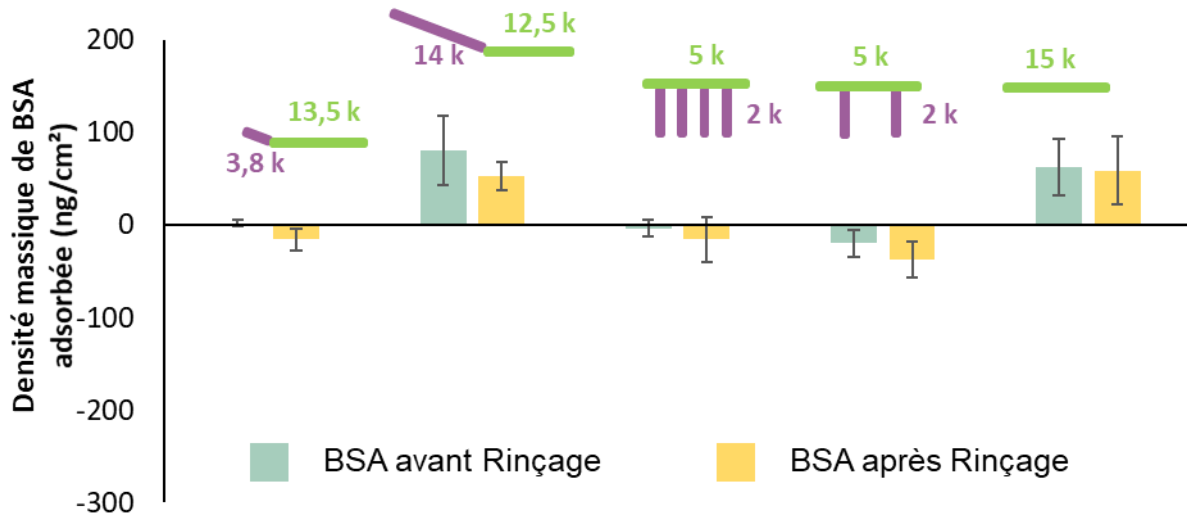


Figure 20 : Densités moyennes de masses déposées ($n=3$) de différents copolymères PAA-PEG déposés à la surface des films (ng/cm^2) et estimées par expérimentation QCM. Les barres d'erreurs représentent l'écart type sur chaque moyenne ($n=3$). Les schémas représentent la structure des copolymères (PEG en violet, PAA en vert) à blocs PAA (13,5) -b- PEG (3,8), PAA (12,5) -b- PEG (14) et greffé PAA (5) -g[0,28]- PEG (2), PAA (5) -g[0,14]- PEG (2). Les résultats proviennent de l'exploitation numérique des variations de fréquence recueillies en QCM lors du dépôt des copolymères avant et après rinçage par le tampon servant à les solubiliser.

Dans un second temps, l'adsorption protéique sur les différents films pégylés a également été étudiée. Ces essais ont été menés en mesurant les variations de fréquences induites par l'injection d'une solution d'albumine bovine à $0,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ en PBS à température ambiante. La figure 21 A et B résulte de l'exploitation numérique des variations de fréquences recueillies en QCM après que les films ont été mis en contact avec une solution d'albumine bovine. Une densité de masse déposée indiquée « positive » sur le graphe correspond à une adsorption protéique en surface du film (Figure 21 A). Une densité de masse déposée indiquée « négative » sur le graphe est le signe d'une désorption d'un ou plusieurs constituants du film consécutif au contact avec l'échantillon protéique.

A



B

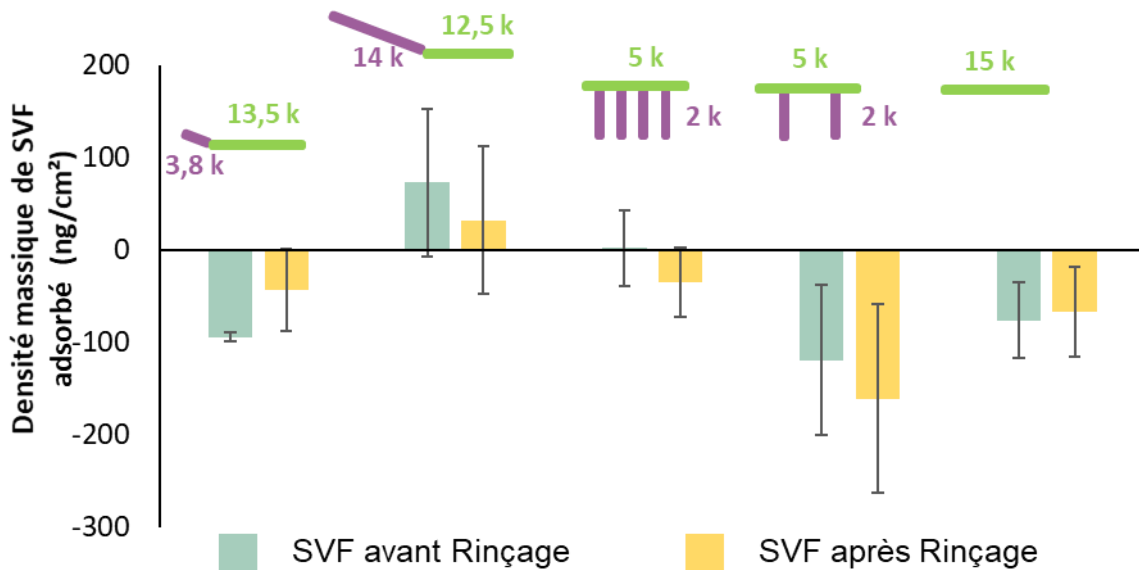


Figure 21 : Mesure de la densité de masse adsorbée d'albumine (BSA) 0,4 g/L et (B) de sérum de veau fœtal (SVF) à 10 % (V/V) sur les films multicouches pégylés ou non, construits à la surface d'un cristal de quartz. Chaque condition a été étudiée en triplicat et sur la figure les schémas des structures de polymère et copolymères indiquent la nature de la dernière couche du film. Le dépôt et le rinçage ont été réalisés selon les mêmes conditions ($V = 500 \mu\text{L}$; $D = 250 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ à 21°C). Les résultats représentent la densité de masse moyenne ($n=3$) en $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ déposée à la surface des films et les barres d'erreurs indiquent l'écart type de chaque série. Ces données ont été calculé avec l'équation de Sauerbrey à partir des variations de fréquence recueillies en QCM lors du contact avec l'échantillon protéiques avant (vert) et après rinçage (jaune) par le tampon PBS.

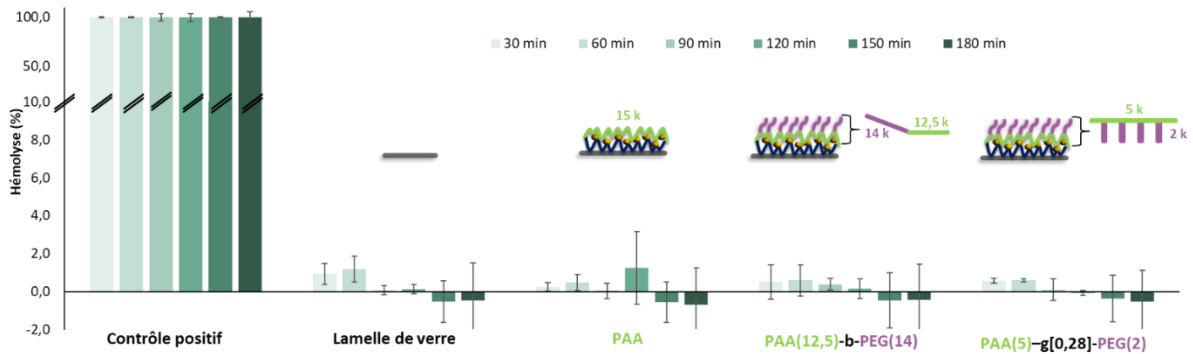
Sur le film témoin, dont la surface est uniquement composée de PAA, on observe une adsorption protéique de l'ordre de 80 ng de BSA par cm^2 de film. On remarque également que cette quantité adsorbée diminue très peu après rinçage avec le tampon, cela signifie que l'interaction des protéines sur la surface est suffisamment forte pour ne pas désorber les protéines lors de l'injection du tampon à un flux de $250 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Une adsorption protéique de l'ordre de 100 ng de BSA par cm^2 de film a été mise en évidence sur le film péglé avec le copolymère à blocs PAA (12,5) -b- PEG (14). Cette quantité diminue après rinçage, démontrant qu'une fraction des protéines adsorbées se désorbent. Enfin, pas ou peu d'adsorption protéique a été mise en évidence sur le copolymère à blocs avec une courte chaîne de PEG (PAA (13,5 k) -b- PEG (3,8 k)) et sur les deux copolymères greffés (PAA(5)-g[0,14]-PEG(2) et PAA(5)-g[0,28]-PEG(2)). Une seconde étude (Figure 21 B) a été réalisée en utilisant du sérum de veau fœtal qui contient une concentration protéique plus élevée (environ 6 g/L) dont de nombreuses autres protéines circulantes (albumine, globulines, lipoprotéines...). Sur le film témoin non péglé ayant uniquement du PAA en surface, une désorption d'environ 5% du film induite par l'échantillon de sérum a été observé. Ceci est également le cas pour le copolymère avec une courte chaîne de PEG, PAA (13,5) -b- PEG (3,8) et pour le copolymère greffé PAA (5) -g[0,14]- PEG (2) avec un faible ratio de greffage PEG. Le copolymère greffé PAA (5) -g[0,28]- PEG (2) avec un ratio élevé de greffage PEG montre peu d'adsorption protéique et c'est aussi celui qui présente le moins de désorption. Pour la suite de l'étude, les copolymères greffés PAA (5) -g[0,28]- PEG (2) et le copolymère à blocs PAA (13,5) -b- PEG (14) seront conservés.

3.2.3.2 Hémolysé

Les GR représentent la plus grande fraction cellulaire du sang (environ 45% de sa composition). La destruction de ces cellules peut s'avérer extrêmement néfaste en réduisant le transport du dioxygène dans l'organisme et la libération d'hémoglobine dans le plasma peut conduire à une altération de la fonction rénale ⁹⁰. L'analyse de leur interaction avec un dispositif médical

intravasculaire est donc l'un des points prioritaires pour l'étude de sa biocompatibilité. L'hémolyse induite par le film multicouche en fonction de sa couche externe a été étudié utilisant deux méthodes complémentaires. La première étude par quantification classique d'hémoglobine libérée de GR de mouton par spectrophotométrie a été réalisé en collaboration avec le Dr Béatrice HEURTAULT de l'équipe de Biovectorologie (UMR 7199) de la faculté de pharmacie de Strasbourg. La seconde méthode correspondant au test de résistance osmotique de GR humains issus de dons a été réalisé en collaboration avec le Dr Julien Perrin du laboratoire DCAC (UMR 1116) de la faculté de médecine de Nancy. (Figure 22 A et B).

A



B

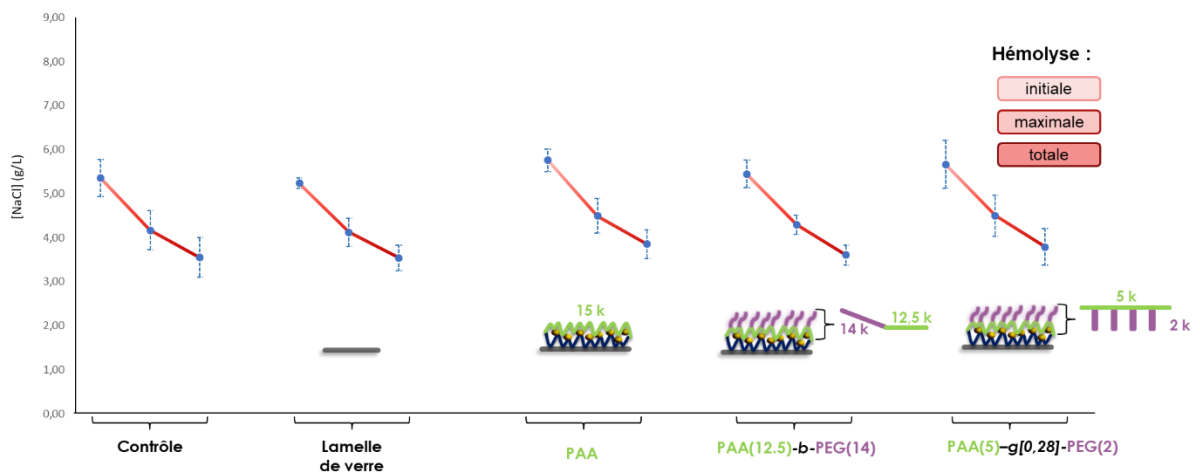


Figure 22 : Cinétique d'hémolyse induite au contact des matériaux « pégylés » ou non déterminée par quantification spectrophotométrique de l'hémoglobine. L'hémolyse totale (contrôle positif) correspond à une solution de $2,5 \times 10^6$ GR dans de l'eau ultra pure pour lyser la totalité des cellules permettant de déterminer la quantité maximale d'hémoglobine. B Etude de la fragilité membranaire par détermination de la concentration en NaCl induisant une hémolyse initiale, maximale et totale. 3 concentrations ont été déterminées : l'hémolyse initiale correspond à la lyse des GR les plus fragiles, l'hémolyse maximale représente la destruction de la majorité des cellules et l'hémolyse totale est la lyse des GR les plus récemment produits (donc les plus résistants).

En première approche, une étude cinétique de l'hémolyse a été effectuée. L'hémoglobine libérée après que la destruction de GR dans le milieu, a été quantifiée toutes les 30 minutes. Une lame de verre a été utilisée comme substrat de référence. Par normalisation avec un témoin positif constitué du même nombre de GR ($2,5 \times 10^6$) dilué dans l'eau ultra pure (100 % d'hémolyse), l'hémolyse induite par les matériaux a pu être déterminée. Les films testés ont tous présentés une hémolyse induite inférieure à 2 % (Figure 22 A). Ainsi, ils peuvent être considérés comme des matériaux non hémolytiques⁹¹. L'expérience de fragilité membranaire est réalisée en incubant des GR humains avec les différentes surfaces pendant 3h à 37 °C. Après cette phase de contact 3 points d'hémolyse ont été déterminés. (Figure 22 B) L'hémolyse initiale cible plutôt les GR les plus âgés donc les plus fragiles, l'hémolyse maximale la majorité des cellules et l'hémolyse totale les plus récemment produits. Cette étude ne montre pas de différence significative entre les matériaux quel que soit le niveau de maturité des GR. Ainsi, l'étude de l'hémolyse par quantification de l'hémoglobine permet d'affirmer qu'il n'y a pas de lyse des GR induite par leur contact avec les matériaux. Le test de fragilité osmotique offre une vision plus fine et permet d'affirmer qu'il n'y a pas non plus de lésion de la membrane entraînant une fragilité des érythrocytes au contact des surfaces.

3.2.3.3 Cytotoxicité

La cytotoxicité des matériaux a été étudiée en cultivant des fibroblastes murins NIH3T3 au contact des films multicouches durant 7 jours. L'activité métabolique de ces cellules a été mise en évidence par la méthode de l'Alamar Blue. Un composé fluorogène, la résazurine, est réduit par l'activité mitochondriale cellulaire en un fluorophore quantifiable par spectrofluorimétrie, la résorufine. Les histogrammes de la figure 23 présentent les résultats obtenus par cette méthode pour plusieurs surfaces étudiées. Pour chaque condition, on observe une augmentation de l'intensité de fluorescence au cours du temps, correspondant à une augmentation de l'activité métabolique des cellules. Quel que soit le substrat, une croissance cellulaire a été mise en

évidence. Ces résultats démontrent que la « pégylation » des surfaces n’empêche pas l’adhésion et la prolifération des cellules. Ainsi, le revêtement développé au travers de ce projet peut être considéré comme non cytotoxique au regard de la norme ISO 10993 ⁴⁶ traitant de l’évaluation biologique des dispositifs médicaux.

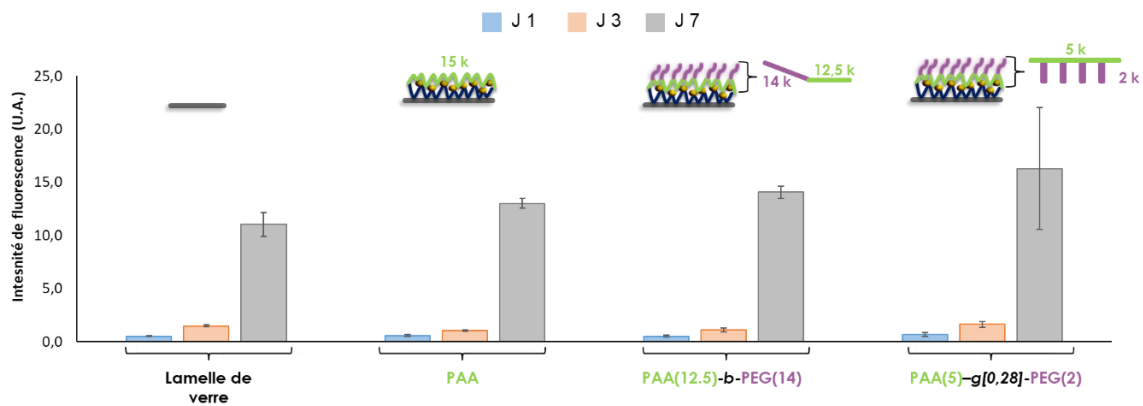


Figure 23 : Mesure de l’activité métabolique (n=3) des fibroblastes murin NIH3T3 au contact des films immobilisant des AuNP par la méthode à l’Alamar Blue à J1 (bleu), J3 (orange) et J7 (gris). Les résultats représentent l’intensité de fluorescence moyenne mesurée (issu de la réduction du fluorogène par l’activité métabolique cellulaire) et les barres d’erreurs indiquent l’écart type de chaque série. Les conditions étudiées sont schématisées sur la figure. Elles correspondent à une lamelle de verre (substrat de référence), un film non « pégylé » (PAA), un film avec en surface le copolymère à blocs PAA (13,5) -b- PEG (14).et enfin un film formé avec le copolymère greffé PAA (5) -g[0,28]- PEG (2).

3.2.3.4 Quantification de l’or

Les expérimentations et résultats présentés dans cette partie s’intéressent à l’interaction entre les surfaces immobilisant des AuNP et le compartiment sanguin en fonction du dernier polymère en surface des films multicouches. Cette dernière couche, en contact direct avec le flux sanguin et les vaisseaux, représente le constituant des films conditionnant majoritairement la biocompatibilité. Cependant, comme nous l’avons vu dans l’article 3 au début de ce chapitre, les AuNP immobilisées au sein des films peuvent également avoir un impact sur l’hémocompatibilité du dispositif. La libération par les films multicouches de nanoparticules d’or (Au⁰) ou d’or ionique (Au⁺³), qui serait issue de leur dégradation, peut présenter un risque

de toxicité. Dans un premier temps, la quantité d'or totale contenu dans un film multicouche a été déterminée (Figure 24). Un film multicouche [PAH-AuNP-PAA]₅ contient 45 nmol d'or, cette quantité de matière correspond donc à celle que l'on mesurerait si 100 % de l'or contenu dans le film était libéré. Dans un second temps, la libération d'or provenant des films a été étudiée (Figure 24) en les incubant 24 h à 37 °C dans 1 mL de milieu de culture des HUVEC. Les films multicouches avec en surface uniquement le PAA et ceux avec les copolymères à blocs PAA (13,5) -*b*- PEG (14) et greffé PAA (5) -*g*[0,28]- PEG (2) ont été étudiés, bien qu'ici il est peu probable que le polymère en surface influence la libération d'or puisque ceux-ci n'assurent pas l'immobilisation des AuNP. L'or présent dans le milieu après incubation quel que soit son état d'oxydation a été quantifié par la méthode analytique décrite dans l'article 2. La quantité d'or émise par les 3 différents films testés de l'ordre de 0,5 nmol a été retrouvée dans le milieu de culture cellulaire. Par comparaison avec la quantité d'or totale contenue dans un film, cette valeur représente une libération d'environ 1%.

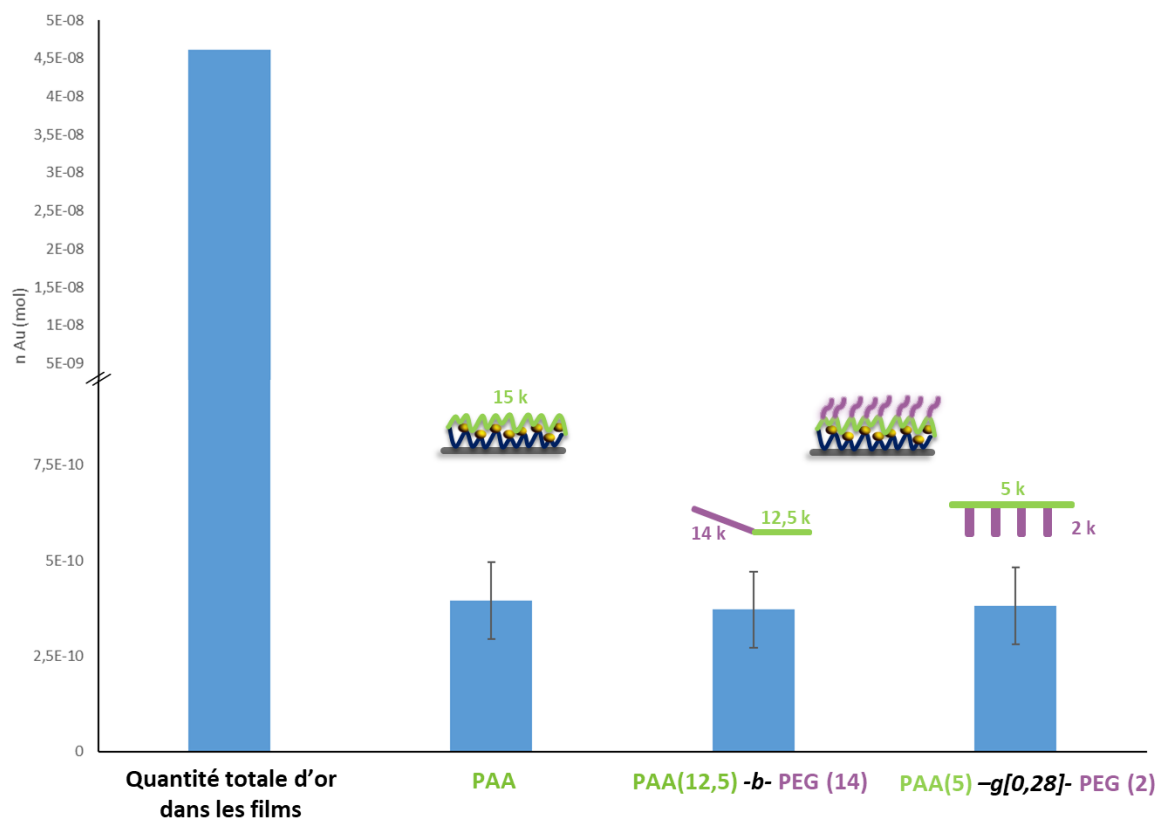


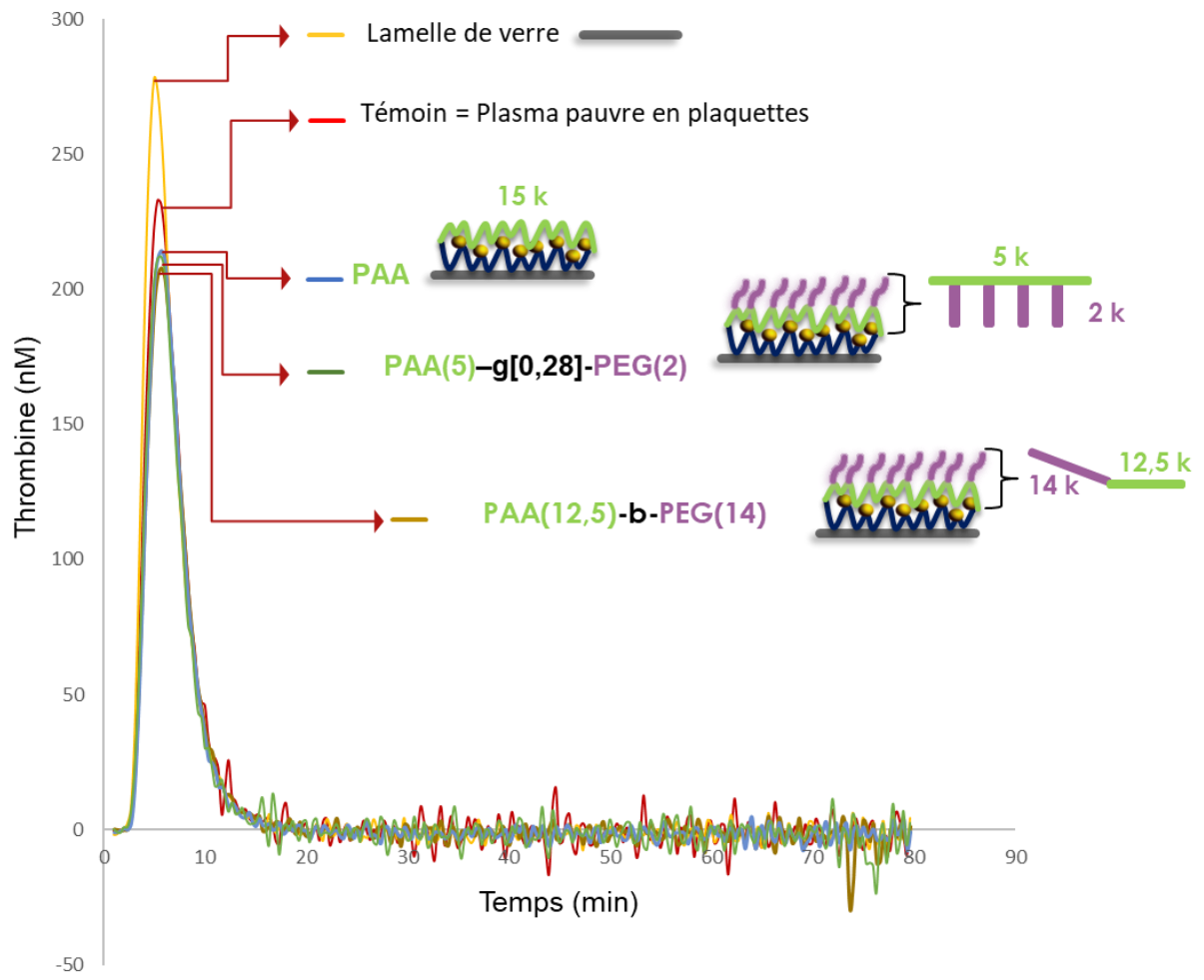
Figure 24 : Quantification de l'or libéré par les films ($n=3$). Les barres d'erreurs représentent l'écart type issu de 3 mesures. Les films ont été incubés 24h dans 1 mL de milieu de culture des cellules endothéliales puis la quantité d'or a été évaluée par une méthode de chromatographie liquide couplée à une détection spectrophotométrique.

3.2.3.5 Coagulation

La thrombine est une des protéines centrales de la cascade de la coagulation ⁹². En condition physiologique, la génération de thrombine résulte de l'activation de la prothrombine initiée par des phospholipides négatifs et le facteur tissulaire produit suite à une lésion vasculaire ⁹³. La prothrombine est une protéine réactive pouvant répondre à d'autres stimuli que ceux décrits précédemment. Il est reconnu que les surfaces ou composés inorganiques portant une charge négative peuvent conduire à la conversion de la prothrombine en thrombine. L'une des interférences les plus décrites en hématologie correspond à l'activation de la coagulation par contact avec une surface en verre ⁹⁴. Ici, l'objectif est d'identifier une possible interférence entre les surfaces immobilisant des AuNP et le système de la coagulation. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Dr Julien Perrin du laboratoire DCAC (UMR 1116). Dans le cadre de

cette expérience, la thrombine plasmatique est activée par ses effecteurs physiologiques (facteur tissulaire à 5 pM et phospholipides négatifs en excès) et la cinétique d'activation permet de déterminer si la réponse moléculaire de la cascade de coagulation est modifiée après contact avec les différentes surfaces. Par comparaison avec un échantillon de plasma témoin pauvre en plaquettes, trois paramètres sont quantifiés. Ainsi, l'intensité de la réponse, son délai d'apparition et l'aire sous la courbe du thrombinogramme peuvent révéler une activité pro- ou anti-coagulante. Sur la figure 25 A, une intensité plus élevée sur l'activation de la thrombine, en comparaison avec le contrôle du plasma pauvre en plaquettes, a été observée après contact avec la lame de verre. Cette activité pro-coagulante portée par le substrat de verre est déjà bien documentée⁹⁴. Le fait intéressant à noter ici est que l'ajout d'un film multicouche sur ce substrat a permis d'enregistrer une intensité plus faible dans l'activation de la thrombine suggérant que le revêtement a une activité antithrombotique suffisante, capable de masquer l'activité pro-thrombotique du verre. Une seconde expérimentation utilisant une concentration de facteur tissulaire moindre (1 pM) (figure 25 B) a été réalisée. Ici, en limitant la quantité de facteur tissulaire, l'intérêt est d'étudier l'aptitude du matériau à mimer la propriété activatrice de cet effecteur. L'activité antithrombotique portée par les films multicouches a été confirmée par le thrombinogramme (Figure 25 B) et le tableau 6 présentant l'exploitation numérique de cette expérimentation. Par comparaison avec la réponse du témoin plasmatique pauvre en plaquette, on observe pour les films multicouches pégylés ou non, un délai d'apparition de la réponse allongée (temps de latence), une intensité moindre (hauteur du pic) et un travail enzymatique de la thrombine diminué. Ici, l'activité antithrombotique maximale était portée par le film multicouche pégylé PAA(5)-g[0,28]-PEG(2) avec une intensité de réponse et un travail enzymatique de la thrombine représentant 80 % de la réponse du plasma témoin.

A



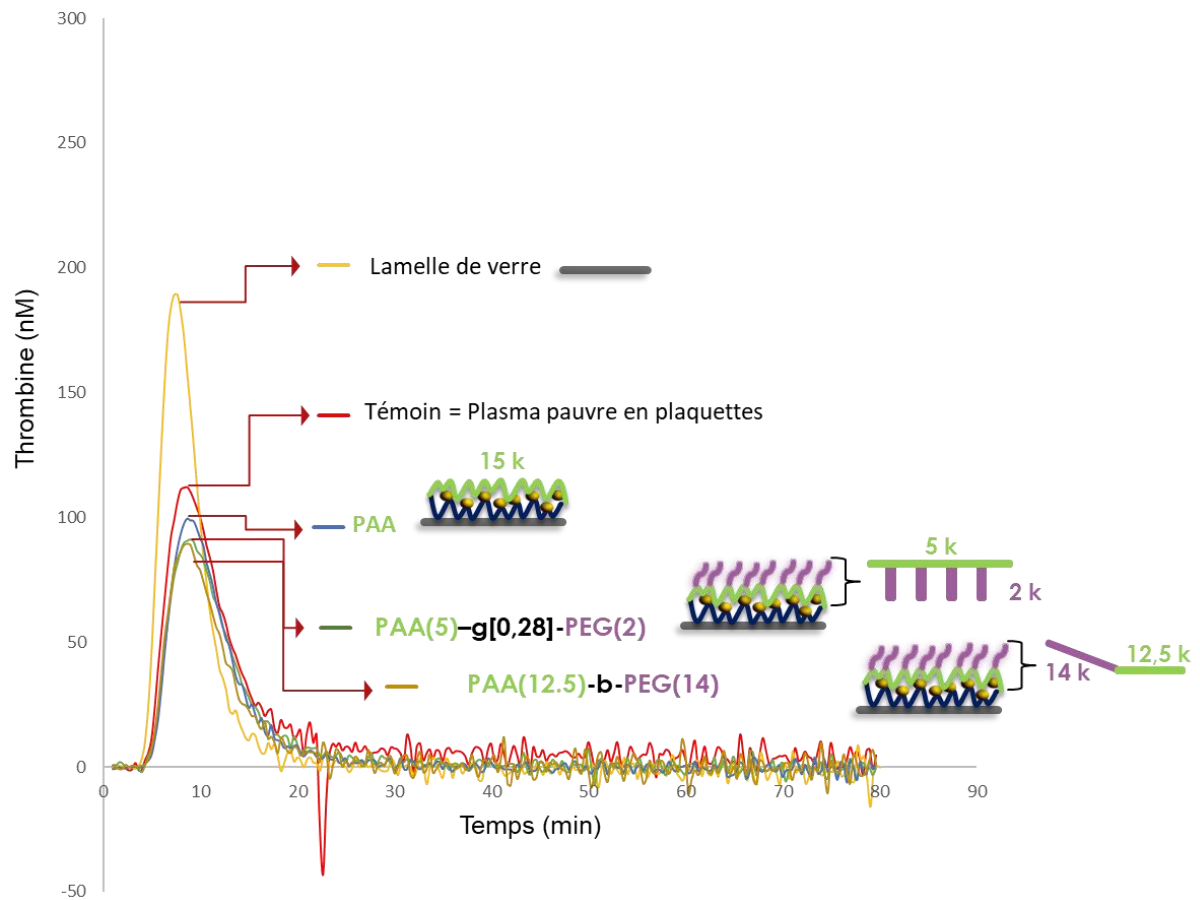
B

Figure 25 : Cinétique d'activation de la thrombine avec 5 pM de facteur tissulaire(A) et avec 1 pM (B). Les conditions étudiées sont, une lamelle de verre (substrat de référence) en jaune, un échantillon témoin de plasma pauvre en plaquettes incubé sans matériaux en rouge, un film non pégylé (PAA) en bleu, un film avec en surface le copolymère greffé PAA (5) -g[0,28]- PEG (2) en vert et enfin un film incorporant le copolymère à blocs PAA (13,5) -b- PEG (14) en or.

Tableau 6 : Paramètres issus de l'exploitation du thrombinogramme (Figure 25 B) réalisé avec 1 pM de facteur tissulaire. Les valeurs présentées sont exprimées en pourcentage par rapport aux résultats obtenus pour la condition témoin plasma pauvre en plaquette sans contact avec les matériaux

Surface	Verre	PAA	PAA(12,5)-b- PEG(14)	PAA(5)-g[0,28]- PEG(2)
Temps de latence (délai d'apparition de la réponse) (s)	92	103	104	104
Hauteur du pic (Intensité de la réponse)	172	81	92	80
Aire sous la courbe (Travail enzymatique de la thrombine) (nM.s)	117	87	89	79

3.3.3.6 Viabilité des cellules endothéliales au contact des surfaces.

L'impact des surfaces sur la prolifération de cellules impliquées dans le processus physiopathologique visé dans ce projet a été étudié. Un stent actif capable de limiter la resténose doit pouvoir favoriser la prolifération des cellules endothéliales. Dans cette partie, des cellules endothéliales humaines de veine ombilicale (HUVEC) ont été cultivées au contact des surfaces recouvertes des films. À l'issue des essais de cytotoxicité réalisés avec des fibroblastes, l'activité métabolique de ces cellules a été déterminée par la méthode à l'Alamar Blue. Un premier essai avec un ensemencement de 1 ml contenant 5×10^4 cellules par surface (d'une aire de $1,14 \text{ cm}^2$) a été réalisé (Figure 26). Sur la lamelle de verre représentant le substrat de référence, l'activité métabolique pour les trois premières mesures a faiblement augmenté, suggérant une prolifération au cours du temps limitée sur ce substrat. Au contact de tous les films multicouches, l'activité métabolique des cellules endothéliales n'a pas varié au cours des 7 jours de suivi suggérant une absence de prolifération sur ces surfaces.

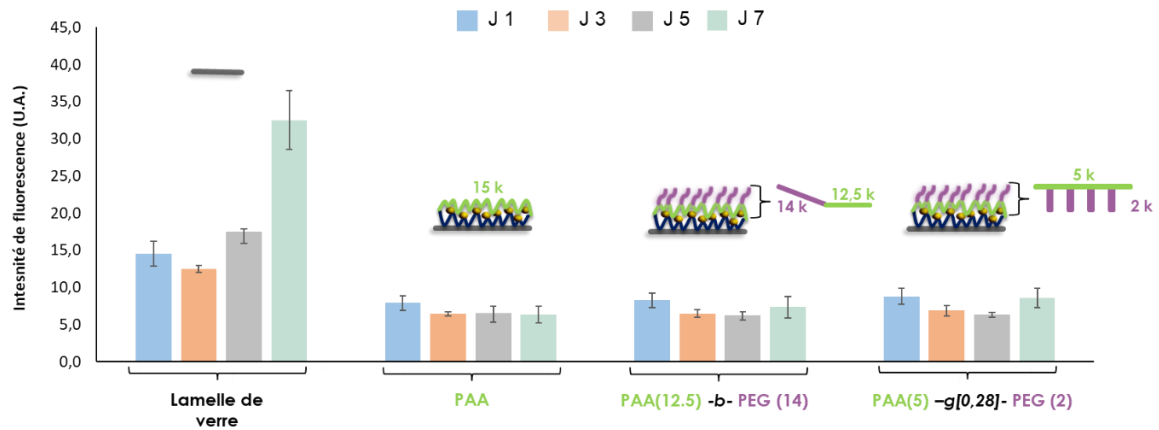


Figure 26 : Mesure de l'activité métabolique de 5×10^4 cellules endothéliales humaines (HUVEC) ensemencées au contact des surfaces immobilisant des AuNP ($n=3$ pour chaque surface) par la méthode à l'Alamar Blue à J1 (bleu), J3 (orange), J5 (gris) J7 (vert). Les résultats représentent l'intensité de fluorescence moyenne mesurée (issue de la réduction du fluorogène par l'activité métabolique cellulaire) et les barres d'erreurs indiquent l'écart type de chaque série. Les conditions étudiées sont schématisées sur la figure. Elles correspondent à une lamelle de verre (substrat de référence), un film non pégylé (PAA), un film avec en surface le copolymère bloc PAA (13,5) -b- PEG (14) et enfin un film formé avec le copolymère greffé PAA (5) -g[0,28]- PEG (2).

Plusieurs travaux ont démontré que le contact intercellulaire avait une incidence sur la régulation de la croissance des cellules endothéliales⁹⁵. Une incidence sur la production des protéines d'adhésion cellulaire⁹⁶, sur la prolifération, et la survie⁹⁷ endothéliale peut être observée. Ici, une faible adhésion cellulaire a été observée au premier jour de l'étude suggérant une densité d'ensemencement cellulaire trop faible. Ainsi, l'effet de cette densité a été étudié en répétant cette expérimentation avec 10^5 cellules ensemencées sur chaque type de surfaces (Figure 27).

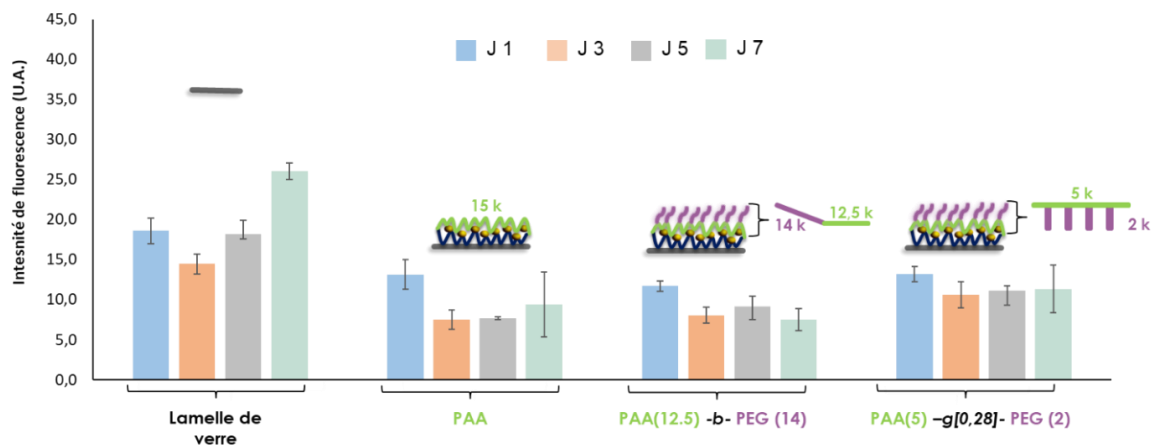


Figure 27 : Mesure de l'activité métabolique de 105 cellules endothéliales humaines (HUVEC) ensemencées au contact des surfaces immobilisant des AuNP ($n=3$ pour chaque surface) par la méthode à l'Alamar Blue à J1 (bleu), J3 (orange), J5 (gris) J7 (vert). Les résultats représentent l'intensité de fluorescence moyenne mesurée (issue de la réduction du fluorogène par l'activité métabolique cellulaire) et les barres d'erreurs indiquent l'écart type de chaque série. Les conditions étudiées sont schématisées sur la figure. Elles correspondent à une lamelle de verre (substrat de référence), un film non pégylé (PAA), un film avec en surface le copolymère à blocs PAA (13,5) -b- PEG (14). et enfin un film formé avec le copolymère greffé PAA (5) -g[0,28]- PEG (2)

Une tendance similaire à celle précédemment décrite avec une prolifération limitée sur le verre et nulle sur les films, a été observée. Au regard de ces résultats, il apparaît que les films, quelle que soit leur composition, entrave la prolifération des cellules. Les substrats étudiés ici, verre et films multicouches, forment *a priori* tous une surface de charge apparente négative. Ainsi, il a été émis l'hypothèse qu'une dernière couche positive formée par le polycation (PAH) pourrait favoriser l'adhésion cellulaire. Enfin, il est admis dans la littérature (*cf* article 1) que le monoxyde d'azote est capable d'induire la prolifération des HUVEC. L'ajout d'un donneur de NO (GSNO à 5 μ M) dans le milieu de culture lors de l'ensemencement pourrait alors stimuler la primo-adhésion puis la croissance des cellules endothéliales. Cet effet du NO sur les cellules endothéliales repose sur l'augmentation de l'activité de la guanylate cyclase qui se traduit par la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Cette voie de signalisation NO-GMPc module l'activation de plusieurs protéines kinases ⁹⁸ permettant la prolifération des cellules endothéliales ⁹⁹.

Les différentes hypothèses développées précédemment ont été testées en ensemencement 5×10^4 cellules sur les films de composition variable avec et sans GSNO (Figure 28). Une surface se terminant par un polyélectrolyte de charge positive a été ajoutée dans ces essais. Pour cela, le polycation PAH est déposé soit en monocouche sur une lamelle de verre soit comme dernière couche d'un film multicouche ([PAH-AuNP-PAA]₅ – PAH). Ces conditions sont comparées à un film bicouche PAH-PAA et un film de construction classique ([PAH-AuNP-PAA]₅). Sur la figure 28, l'activité métabolique mesurée pour la condition monocouche de PAH a été trouvée inférieure à celle de la condition film bicouche de [PAH-PAA] dès le premier jour de culture. Ce même résultat a été observé avec les films multicouches des conditions [PAH-AuNP-PAA]₅ – PAH et [PAH-AuNP-PAA]₅ : la dernière couche de PAH semble avoir un effet négatif sur la prolifération par comparaison à une dernière couche de PAA, l'adhésion cellulaire ne semble donc pas être favorisée par l'ajout d'une couche externe positive. Dans tous les cas, l'utilisation de polyélectrolytes comme revêtement sur les lamelles semble ralentir la prolifération durant la période étudiée (7 jours).

Enfin, pour toutes les conditions à l'exception de la dernière pour lesquelles les cellules endothéliales étaient cultivées sur les films multicouches [PAH-AuNP-PAA]₅, aucune différence en termes d'intensité d'activité métabolique n'a été mise en évidence avec et sans GSNO (5 μ M). Sur la dernière condition [PAH-AuNP-PAA]₅, on observe une activité métabolique supérieure en présence de GSNO. Cependant, celle-ci reste inférieure aux résultats obtenus pour la condition témoin (cellules cultivées au contact des lamelles de verre) suggérant que la supplémentation n'a pas un effet suffisant pour permettre une croissance supérieure au témoin des cellules endothéliales sur les films multicouches.

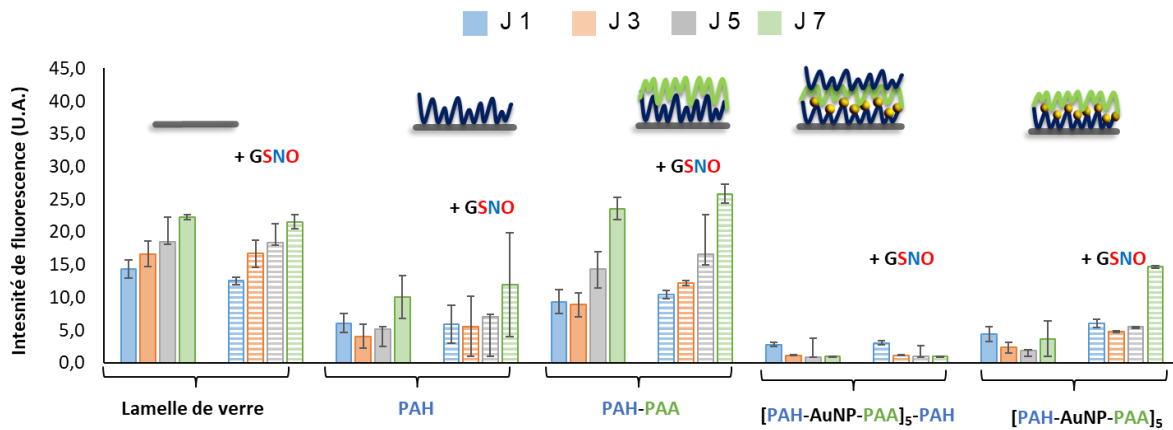


Figure 28 : Etude de l'activité métabolique ($n=3$ pour chaque surface) des cellules endothéliales humaines (HUVEC) en fonction de la composition des films multicouches et de l'ajout d'un donneur de NO (condition : + GSNO ($5 \mu\text{M}$), symbolisée par les hachures horizontales) dans le milieu de culture cellulaire par la méthode à l'Alamar Blue à J1 (bleu), J3 (orange), J5 (gris) J7 (vert). Les résultats représentent l'intensité de fluorescence moyenne mesurée (issue de la réduction du fluorogène par l'activité métabolique cellulaire) et les barres d'erreurs indiquent l'écart type de chaque série. Les surfaces étudiées sont schématisées sur la figure. Elles correspondent à une lamelle de verre (substrat de référence), un film monocouche de polycation PAH, un film bicouche formé par la paire de polyélectrolytes PAH- PAA, un film multicouche [PAH-AuNP-PAA]₅-PAH ayant pour dernière couche le polycation PAH et enfin un film multicouche [PAH-AuNP-PAA]₅.

Le milieu de culture des HUVEC (Endothelial Cell Growth Medium MV) du fournisseur Promocell contient plusieurs suppléments en plus des 5% de sérum de veau fœtal : de l'hydrocortisone (1 mg/L), l'héparine (90 mg/L), un supplément de croissance endothélial (4 mL /L) et un facteur de croissance épidermique ($10 \mu\text{g/L}$). Ainsi, il est possible que la composition de ce milieu très riche en suppléments masque l'effet prolifératif apporté par le GSNO.

L'étude suivante a recherché à varier la composition du milieu lors de la mise en culture cellulaire sur lamelle de verre afin de tenter de mettre en lumière un effet prolifératif apporté par le GSNO (Figure 29). Deux modifications du milieu ont été considérées : le pourcentage de sérum de veau fœtal et la composition en supplément de croissance. Il a été fait le choix de ne conserver que le supplément de croissance endothélial et l'héparine et de tester l'effet de leur ajout ou retrait. Sur la figure 29, on observe une absence de prolifération pour les conditions à

0, 2 et 3% de sérum sans supplément quelle que soit la concentration de GSNO ajoutée. Ainsi, ces conditions apparaissent trop pauvres pour permettre la croissance des cellules endothéliales. Dans les deux conditions 3 et 5 % de sérum avec supplément, une croissance cellulaire a été observée. Cependant, lorsque l'on s'intéresse à l'effet du GSNO dans ces conditions, on remarque soit une absence d'effet du GSNO à faible concentration (5 μM) soit un effet inhibiteur aux fortes concentrations (15 et 45 μM). Cette inhibition peut être attribuée à une dégradation trop brutale du GSNO par les composants du milieu (protéines, vitamines, réducteurs...) induisant une libération massive de NO. Ceci peut causer un stress nitrosant aboutissant à une perturbation des voies de signalisation cellulaire par la nitration de protéines¹⁰⁰ et provoquant des lésions à l'ADN¹⁰¹. L'ensemble de ces signaux pro-apoptotiques conduit à la surexpression du gène codant le facteur p53¹⁰² qui pourrait être mise en évidence via sa quantification par une méthode de RT-PCR

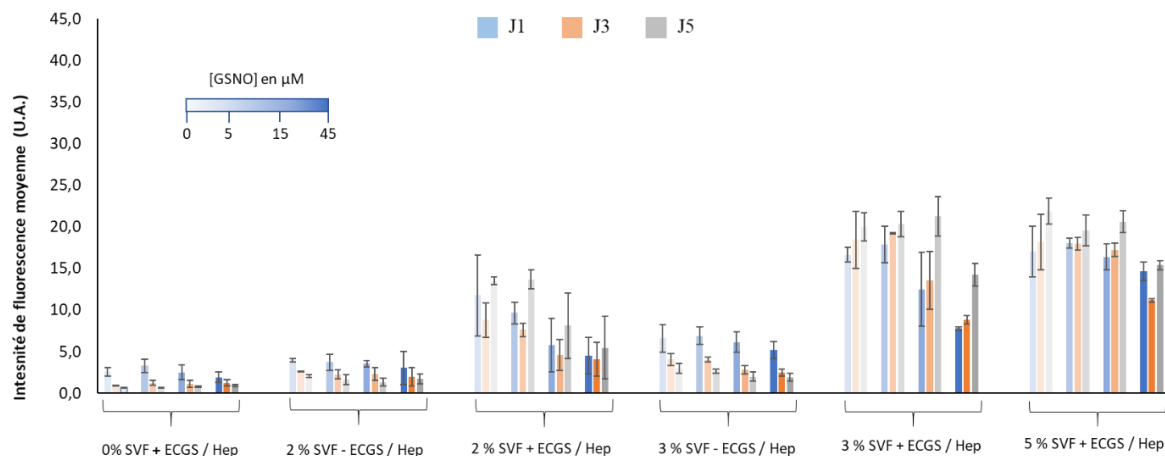


Figure 29 : Etude de l'influence de la composition du milieu (en pourcentage de sérum de veau fœtal (SVF) avec ou sans les suppléments Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS) et Héparine (Hep)) et de la concentration d'un ajout unique de GSNO (5, 15 et 45 μM) sur l'activité métabolique des cellules endothéliales cultivées sur des lamelles de verre ($n=3$) par la méthode à l'Alamar Blue à J1 (bleu), J3 (orange) et J5 (gris). Les différentes concentrations en GSNO sont symbolisées par les dégradés de couleur comme le suggère le schéma ([GSNO] en μM). Les résultats représentent l'intensité de fluorescence moyenne mesurée (issue de la

réduction du fluorogène par l'activité métabolique cellulaire) et les barres d'erreurs indiquent l'écart type de chaque série).

Afin de disposer d'une libération plus continue de NO qui mimerait l'action portée par une surface fonctionnalisée, une supplémentation en continue par l'apport de GSNO toutes les 12 heures dans le milieu de culture a été envisagée (Figure 30). Cette étude reprend une composition du milieu de culture cellulaire de 3 % de sérum de veau fœtal avec supplément. Cette condition avait été identifiée comme étant la composition la plus simple permettant toujours la croissance des HUVEC. En plus des points aux jours 1, 3 et 5 une mesure a été ajoutée à 4 h pour étudier l'effet du GSNO sur la primo-adhésion cellulaire. Ici, quelle que soit la concentration considérée, l'apport progressif de GSNO dans la culture n'a pas permis d'augmenter l'activité métabolique des cellules endothéliales, montrant même un effet inhibiteur pour la plus forte concentration (5 μ M) .

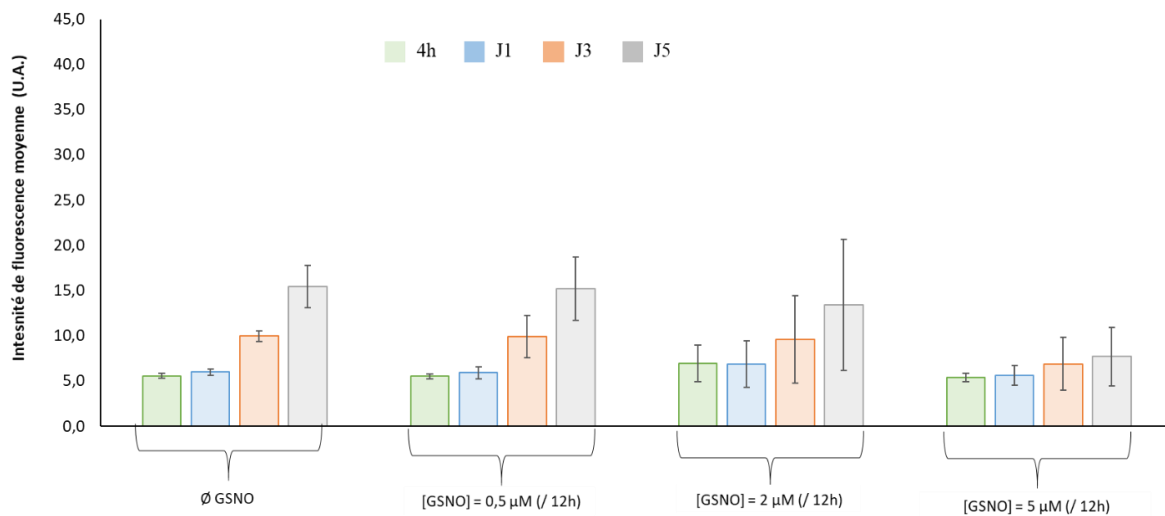


Figure 30 : Etude de l'influence d'ajouts successifs de GSNO (0,5 ,2 et 5 μ M toutes les 12 h) sur l'activité métabolique des cellules endothéliales cultivées sur des lamelles de verre (n=3) par la méthode à l'Alamar Blue à 4h (vert), J1 (bleu), J3 (orange) et J5(gris). Les résultats représentent l'intensité de fluorescence moyenne mesurée (issu de la réduction du fluorogène par l'activité métabolique cellulaire) et les barres d'erreurs indiquent l'écart type de chaque série.

3.2.4 Conclusion et perspectives

La « pégylation » des surfaces immobilisant des AuNP a été envisagée pour renforcer leur biocompatibilité vis-à-vis du compartiment sanguin. L'adhésion protéique sur une surface a été identifiée dans la littérature comme étant le principal élément déclencheur de phénomènes délétères. Ici, nous avons utilisé la mesure de l'adsorption protéique par QCM comme un test de screening pour effectuer une première sélection des quatre copolymères envisagés. Le copolymère greffé PAA(5)-g[0,28]-PEG(2) avec un fort ratio a été celui présentant une résistance à l'adsorption protéique la plus satisfaisante vis-à-vis de l'albumine et du sérum. Cette surface s'est aussi montrée non hémolytique, non cytotoxique avec une libération d'or inférieure à 1 % de ce qui est chargé. L'étude de la cinétique d'activation de la thrombine avec du plasma pauvre en plaquettes a révélé que ce film provoque une activation de la thrombine inférieure en comparaison au plasma témoin. Afin d'étudier l'interaction des thrombocytes avec les surfaces étudiées, la cinétique d'activation de la thrombine sera prochainement étudiée à partir de plasma riche en plaquette. En cas d'adhésion et d'activation des plaquettes au contact des films multicouches, une activation supérieure de la thrombine pourrait être observée. Dans ce contexte, la résistance à l'adsorption propriété portée par les surfaces « pégylées » pourrait s'avérer bénéfique. Un premier modèle cellulaire (fibroblastes murins NIH3T3) a permis de s'assurer de l'absence de cytotoxicité porté par les films multicouches avec ou sans PEG. Puis un second modèle cellulaire (cellules endothéliales HUVEC) correspondant au contexte physiopathologique de ce projet a été étudié. Cependant, plusieurs limitations ont été identifiées. Dans un premier temps, une absence de prolifération des HUVEC au contact des films multicouches avec ou sans PEG a été mise en évidence. Dans un second temps, la supplémentation des cultures d'HUVEC par GSNO s'est avérée inefficace. Ce résultat va à l'encontre des données de la littérature sur l'effet prolifératif du GSNO (voir l'article de revue du chapitre 1). Les difficultés rencontrées au cours de cette étude pourraient être liées à la

souche cellulaire cultivée. En effet, les HUVEC utilisées étaient issues d'un donneur unique possédant potentiellement un phénotype ne répondant pas à la stimulation par le GSNO. L'utilisation d'une culture cellulaire formée par un pool de cellules provenant de plusieurs donneurs permettrait de limiter l'effet des variations inter-individus. Les effets du NO sur les cellules endothéliales reposent sur l'augmentation de l'activité de la guanylate cyclase qui se traduit par la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Ici, la quantification de cette production de GMPc par les cellules endothéliales pourrait permettre de déterminer si le type de cellules que nous avons utilisé au cours de cette étude est apte à répondre à une stimulation par le NO.

Conclusion générale et perspectives

Ce projet de doctorat était articulé autour de la création d'un film multicouche composé de polyélectrolytes et de nanoparticules d'or fonctionnalisées par des donneurs de NO de type S-nitrosothiols, depuis la phase de fonctionnalisation de la surface jusqu'à son évaluation biologique en termes de biocompatibilité et d'efficacité thérapeutique.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont permis de répondre à plusieurs objectifs.

Premièrement, la revue générale de la littérature du chapitre 1 (article 1 en cours de finalisation) a décrit les différentes stratégies permettant de créer une surface libérant ou générant du NO. Elle représente ainsi une vision globale des stratégies qui pourraient être appliquées à ce projet. De plus, elle fait écho aux difficultés rencontrées dans le chapitre 2. En effet, la fonctionnalisation des matériaux par des RSNO liés de manière covalente est probablement la stratégie la plus complexe. L'obtention d'une charge élevée en NO est problématique, principalement parce que les fonctions thiols et S-nitrosothiols sont très sensibles à l'oxydation. Mais cette stratégie reste intéressante à développer car elle imite la forme physiologique de stockage du NO et ne présente donc pas de risque de toxicité. Et cette fonctionnalisation ne présente pas les défauts des surfaces génératrices de NO dont l'activité peut être limitée en cas de déficience des sources endogènes de NO, ce qui se produit fréquemment en situation pathophysiologique.

Dans un second temps, au sein du chapitre 2, nous avons décrit une stratégie analytique permettant de caractériser et d'optimiser la construction de films multicouches selon deux critères, la quantité d'AuNP immobilisées et la stabilité de l'ensemble de la construction. Ces travaux ont été valorisés par la publication d'un article (article 2) qui expose les conditions optimales de constructions des films multicouches. Puis dans la seconde partie de ce chapitre, nous avons décrit la stratégie de fonctionnalisation des surfaces par le NO *via* la fonctionnalisation des AuNP avant leur inclusion dans les films. Cette méthode a permis d'atteindre une charge en NO similaire à celle rencontrée dans la littérature pour des

constructions équivalentes. Cependant, elle n'a pas permis de remplir le cahier des charges fixé en termes de quantité de NO. L'alternative proposée dans ce chapitre repose sur la création d'une surface catalytique capable de générer du NO à partir de sources endogènes.

Enfin le dernier chapitre était dévolu à l'étude de l'hémocompatibilité des revêtements immobilisant des AuNP. Dans un premier temps, nous avons développé un modèle d'étude de l'hémocompatibilité des AuNP selon leur chimie de surface. L'ensemble de ces travaux ont abouti à la publication d'un article (article 3) proposant les caractéristiques que doit présenter un ligand de surface pour favoriser l'hémocompatibilité des AuNP colloïdales. Et dans le contexte global de ce projet de thèse, cet article a permis de créer un modèle d'étude dont les méthodes et les conclusions sont applicables à l'étude de la biocompatibilité de surfaces immobilisant des AuNP.

Pour finir dans la dernière partie du chapitre 3, nous avons travaillé au renforcement de la biocompatibilité des films multicouches vis-à-vis du compartiment sanguin grâce à la pégylation de leur surface. L'utilisation d'un copolymère de PAA greffé par un fort taux de PEG a permis la création d'une surface antithrombotique, non hémolytique, non cytotoxique et présentant une résistance à l'adsorption protéique. Un modèle cellulaire (cellules endothéliales HUVEC) correspondant au contexte physiopathologique de ce projet a été étudié. Cependant, une absence de prolifération de ces cellules au contact des surfaces pégylés a été identifié. Ici, le recours à une surface libérant ou générant du NO représente un moyen de lever ce verrou scientifique.

Enfin, ces dernières années les innovations dans le domaine des bio-matériaux profitent particulièrement des essors de l'ingénierie tissulaire et de la médecine personnalisée. Dans le contexte de ce projet, la création d'une endoprothèse vasculaire pré-cellularisée par des cellules endothéliales autologues permettrait de recréer un endothélium sain possédant une biocompatibilité optimale et une activité sécrétrice en NO physiologique. Dans le contexte de

ce projet, le biomatériau développé doit restaurer l'homéostasie vasculaire *via* un revêtement biocompatible libérant un médiateur physiologique (le NO) mimant l'activité de l'endothélium. Une perspective d'évolution intéressante de ce projet pourrait être la création d'une surface dite endothélialisée qui permettrait de générer un endothélium sain possédant une biocompatibilité optimale et une activité sécrétrice en NO physiologique.

La création d'une telle endoprothèse vasculaire peut être atteinte selon deux méthodes. La première repose sur la création d'un DMI recouvert d'une matrice permettant l'adhésion et la croissance *in vitro* de cellules endothéliales autologues. Ce DMI serait implanté une fois qu'une couche cellulaire confluite en surface est atteinte. Cependant cette méthode qui nécessite un certain temps de développement (prélèvement de cellules puis croissance jusqu'à confluence) n'est pas toujours envisageable dans le contexte des maladies ischémiques puisque celles-ci requièrent souvent une intervention chirurgicale urgente. La seconde méthode repose sur le développement d'un DMI capable d'induire *in vivo* le recrutement des cellules progénitrices endothéliales circulant dans le sang¹⁰³. Le développement de ce type de surface peut être atteint *via* l'ajout en surface du DMI de récepteur ou peptides d'adhésion des cellules endothéliales tels que le peptide :Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg « YIGSR »¹⁰⁴. Une surface arborant un motif PEG-YIGSR crée un système combinant une biocompatibilité passive et active. La pégylation limite l'adhésion non spécifique des protéines et cellules circulantes tandis que la séquence peptidique favorise le recrutement des progéniteurs endothéliaux¹⁰⁵. Cette stratégie serait particulièrement appropriée au revêtement fonctionnalisé développé dans ce projet. La pégylation et la libération de NO offrirait une gestion à court terme de la biocompatibilité du DMI puis l'endothélialisation de sa surface permettrait une activité thérapeutique long terme.

Bibliographie

1. Bennett, M. R. & O'Sullivan, M. Mechanisms of angioplasty and stent restenosis: implications for design of rational therapy. *Pharmacol. Ther.* **91**, 149–166 (2001).
2. Bennett, M. R. In-Stent Stenosis: pathology and implications for the development of drug eluting stents. *Heart* **89**, 218–224 (2003).
3. Fischman, D. L. *et al.* A Randomized Comparison of Coronary-Stent Placement and Balloon Angioplasty in the Treatment of Coronary Artery Disease. *N. Engl. J. Med.* **331**, 496–501 (1994).
4. Jeewandara, T., Wise, S. & Ng, M. Biocompatibility of Coronary Stents. *Materials* **7**, 769–786 (2014).
5. Carpenter, A. W. & Schoenfisch, M. H. Nitric oxide release: Part II. Therapeutic applications. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 3742 (2012).
6. Lee, J., Lee, H. & Andrade, J. Blood compatibility of polyethylene oxide surfaces. *Prog. Polym. Sci.* **20**, 1043–1079 (1995).
7. Tournebize, J. *et al.* Simple spectrophotometric method for quantitative determination of gold in nanoparticles. *Talanta* **83**, 1780–1783 (2011).
8. Tournebize, J. *et al.* Role of gold nanoparticles capping density on stability and surface reactivity to design drug delivery platforms. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **4**, 5790–5799 (2012).
9. Luo, M. *et al.* Gold nanoparticles grafted by reduced glutathione with thiol function preservation. *Colloid Interface Sci. Commun.* **14**, 8–12 (2016).
10. Pallotta, A. *et al.* Blood compatibility of multilayered polyelectrolyte films containing immobilized gold Nanoparticles. *Part. Part. Syst. Charact.* **34**, 1600184 (2017).
11. OMS. Les 10 principales causes de mortalité. <https://www.who.int/fr/news-room/factsheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
12. HAS. Evaluation des endoprothèses coronaires à libération de principe actif. [Http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2009-10/evaluation_des_endoprotheses_coronaires_a_liberation_de_principe_actif.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2009-10/evaluation_des_endoprotheses_coronaires_a_liberation_de_principe_actif.pdf).
13. Heidenreich, P. A. *et al.* Forecasting the future of cardiovascular disease in the united states: a policy statement from the american heart association. *Circulation* **123**, 933–944 (2011).
14. Serro, A. P. *et al.* A comparative study of titanium nitrides, tin, tinbn and ticn, as coatings for biomedical applications. *Surf. Coat. Technol.* **203**, 3701–3707 (2009).
15. Subramanian, B., Brindha, G., Makoto, T., Hiroshi, N. & Akira, K. Evaluation of plasma ion beam sputtered tin / tialn multilayers on steel for bio implant applications. 4 (2011).
16. Puranik, A. S., Dawson, E. R. & Peppas, N. A. Recent advances in drug eluting stents. *Int. J. Pharm.* **441**, 665–679 (2013).
17. Takahashi, H., Letourneur, D. & Grainger, D. W. Delivery of Large Biopharmaceuticals from Cardiovascular Stents: A Review. *Biomacromolecules* **8**, 3281–3293 (2007).
18. Qian, J. & Fulton, D. Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. *Front. Physiol.* **4**, (2013).
19. Brecht, D. S. & Snyder, S. H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 175–195 (1994).
20. Decher, G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. *Science* **277**, 1232–1237 (1997).

21. Lavallo, P. *Et al.* Dynamic aspects of films prepared by a sequential deposition of species: perspectives for smart and responsive materials. *Adv. Mater.* **23**, 1191–1221 (2011).
22. Özçelik, H. *Et al.* Harnessing the multifunctionality in nature: a bioactive agent release system with self-antimicrobial and immunomodulatory properties. *Adv. Healthc. Mater.* **4**, 2026–2036 (2015).
23. Jin, Z., Feng, W., Zhu, S., Sheardown, H. & L. Brash, J. Protein-resistant polyurethane by sequential grafting of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and poly(oligo(ethylene glycol) methacrylate) via surface-initiated ATRP. *J. Biomed. Mater. Res. A* **95A**, 1223–1232 (2010).
24. Kumar, S., Tong, X., Dory, Y. L., Lepage, M. & Zhao, Y. A CO₂ switchable polymer brush for reversible capture and release of proteins. *Chem Commun* **49**, 90–92 (2013).
25. Gribova, V., Auzely-Velty, R. & Picart, C. Polyelectrolyte multilayer assemblies on materials surfaces: from cell adhesion to tissue engineering. *Chem. Mater.* **24**, 854–869 (2012).
26. Acharya, G., Lee, C. H. & Lee, Y. Optimization of cardiovascular stent against restenosis: factorial design-based statistical analysis of polymer coating conditions. *Plos ONE* **7**, e43100 (2012).
27. Pavlukhina, S. & Sukhishvili, S. Polymer assemblies for controlled delivery of bioactive molecules from surfaces. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 822–836 (2011).
28. Liu, Y., Chen, W. & Kim, H.-I. Antibacterial activity of pH-sensitive genipin cross-linked chitosan/poly(ethylene glycol)/silver nanocomposites. *Polym. Adv. Technol.* **23**, 8–14 (2012).
29. Liu, S. *Et al.* Antibacterial antiadhesion membranes from silver-nanoparticle-doped electrospun poly(L-lactide) nanofibers. *J. Appl. Polym. Sci.* **129**, 3459–3465 (2013).
30. Vrana, N. E. *Et al.* Double entrapment of growth factors by nanoparticles loaded into polyelectrolyte multilayer films. *J. Mater. Chem. B* **2**, 999 (2014).
31. Kim, C.-Y., Xu, L., Lee, E.-H. & Choa, Y.-H. Magnetic silicone composites with uniform nanoparticle dispersion as a biomedical stent coating for hyperthermia. *Adv. Polym. Technol.* **32**, E714–E723 (2013).
32. Beurton, J. *Et al.* Long-lasting and controlled antioxidant property of immobilized gold nanoparticles for intelligent packaging. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **176**, 439–448 (2019).
33. Elahi, N., Kamali, M. & Baghersad, M. H. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta* **184**, 537–556 (2018).
34. Turkevich, J., Stevenson, P. C. & Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* **11**, 55 (1951).
35. Pallotta, A., Boudier, A., Leroy, P. & Clarot, I. Characterization and stability of gold nanoparticles depending on their surface chemistry: Contribution of capillary zone electrophoresis to a quality control. *J. Chromatogr. A* **1461**, 179–184 (2016).
36. Daniel, M.-C. & Astruc, D. Gold Nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. **54**.
37. Al-Johani, H. *Et al.* The structure and binding mode of citrate in the stabilization of gold nanoparticles. *Nat. Chem.* **9**, 890–895 (2017).
38. Tournebize, J. *Et al.* Impact of gold nanoparticle coating on redox homeostasis. *Int. J. Pharm.* **438**, 107–116 (2012).

39. *DIRECTIVE 93/42/CEE DU CONSEIL du 14 juin 1993 relative aux dispositifs médicaux.*
40. Brash, J. L. The fate of fibrinogen following adsorption at the blood-biomaterial, interface. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **516**, 206–222 (1987).
41. Gorbet, M. B. & Sefton, M. V. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials* **25**, 5681–5703 (2004).
42. Tsai, W.-B., Grunkemeier, J. M., mcfarland, C. D. & Horbett, T. A. Platelet adhesion to polystyrene-based surfaces preadsorbed with plasmas selectively depleted in fibrinogen, fibronectin, vitronectin, or von Willebrand's factor. *J. Biomed. Mater. Res.* **60**, 348–359 (2002).
43. Jin, R. C., Voetsch, B. & Loscalzo, J. Endogenous mechanisms of inhibition of platelet function. *Microcirculation* **12**, 247–258 (2005).
44. Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K. & Lambris, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* **11**, 785–797 (2010).
45. Salvadormorales, C. *Et al.* Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Mol. Immunol.* **43**, 193–201 (2006).
46. Use of International Standard ISO 10993-1, 'Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing within a risk management process' - Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff. 68.
47. Liu, X. *Et al.* Blood compatible materials: state of the art. *J Mater Chem B* **2**, 5718–5738 (2014).
48. Morra, M. On the molecular basis of fouling resistance. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **11**, 547–569 (2000).
49. Ostuni, E., Chapman, R. G., Holmlin, R. E., Takayama, S. & Whitesides, G. M. A Survey of Structure–Property relationships of surfaces that resist the adsorption of protein. *Langmuir* **17**, 5605–5620 (2001).
50. Chen, S., Li, L., Zhao, C. & Zheng, J. Surface hydration: Principles and applications toward low-fouling/nonfouling biomaterials. *Polymer* **51**, 5283–5293 (2010).
51. Kenausis, G. L. *Et al.* Poly(L-lysine)-g-Poly(ethylene glycol) layers on metal oxide surfaces: attachment mechanism and effects of polymer architecture on resistance to protein adsorption †. *J. Phys. Chem. B* **104**, 3298–3309 (2000).
52. Whiffen, J. D., Young, W. P. & Gott, V. L. Stability of the thrombus-resistant graphite-benzalkonium-heparin surface in an anti-heparin environment. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **48**, 317–322 (1964).
53. Zhu, T. *Et al.* Coronary stents decorated by heparin/nonoate nanoparticles for anticoagulant and endothelialized effects. *Langmuir* **36**, 2901–2910 (2020).
54. Simon-Walker, R. *Et al.* Glycocalyx-inspired nitric oxide-releasing surfaces reduce platelet adhesion and activation on titanium. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **3**, 68–77 (2017).
55. Loscalzo, J. & Welch, G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **38**, 87–104 (1995).
56. Mendelsohn, M. E., O'Neill, S., George, D. & Loscalzo, J. Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine. *J. Biol. Chem.* **265**, 19028–19034 (1990).

57. Kubes, P., Suzuki, M. & Granger, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 4651–4655 (1991).
58. Costa, R. R. & Mano, J. F. Polyelectrolyte multilayered assemblies in biomedical technologies. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 3453 (2014).
59. Decher, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* **277**, 1232–1237 (1997).
60. Kim, K., Ryoo, H., Lee, Y. M. & Shin, K. S. Adsorption characteristics of Au nanoparticles onto poly(4-vinylpyridine) surface revealed by QCM, AFM, UV/vis, and Raman scattering spectroscopy. *J. Colloid Interface Sci.* **342**, 479–484 (2010).
61. Pallotta, A., Philippe, V., Boudier, A., Leroy, P. & Clarot, I. Highly sensitive and simple liquid chromatography assay with ion-pairing extraction and visible detection for quantification of gold from nanoparticles. *Talanta* **179**, 307–311 (2018).
62. Broniowska, K. A. & Hogg, N. The chemical biology of s-nitrosothiols. *Antioxid. Redox Signal.* **17**, 969–980 (2012).
63. Wang, C., Yan, Q., Liu, H.-B., Zhou, X.-H. & Xiao, S.-J. Different edc/nhs activation mechanisms between paa and pmaa brushes and the following amidation reactions. *Langmuir* **27**, 12058–12068 (2011).
64. Nuzzo, R. G., Zegarski, B. R. & Dubois, L. H. Fundamental studies of the chemisorption of organosulfur compounds on gold(111). Implications for molecular self-assembly on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 733–740 (1987).
65. Budy, S. M., Hamilton, D. J., Cai, Y., Knowles, M. K. & Reed, S. M. Polymer mediated layer-by-layer assembly of different shaped gold nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **487**, 336–347 (2017).
66. De Mel, A., Murad, F. & Seifalian, A. M. Nitric oxide: a guardian for vascular grafts? *Chem. Rev.* **111**, 5742–5767 (2011).
67. Hetrick, E. M. & Schoenfisch, M. H. Analytical chemistry of nitric oxide. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2**, 409–433 (2009).
68. Sun, J., Zhang, X., Broderick, M. & Fein, H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using griess reaction assay. *Sensors* **3**, 276–284 (2003).
69. Shen, Y., Zhang, Q., Qian, X. & Yang, Y. Practical Assay for Nitrite and Nitrosothiol as an Alternative to the Griess Assay or the 2,3-Diaminonaphthalene Assay. *Anal. Chem.* **87**, 1274–1280 (2015).
70. Brown, M. D. & Schoenfisch, M. H. Electrochemical nitric oxide sensors: principles of design and characterization. *Chem. Rev.* **119**, 11551–11575 (2019).
71. Chaudiere, J., Courtin, O. & Leclaire, J. Glutathione oxidase activity of selenocystamine: A mechanistic study. *Arch. Biochem. Biophys.* **296**, 328–336 (1992).
72. Tang, D. *Et al.* Regulation of macrophage polarization and promotion of endothelialization by NO generating and PEG-YIGSR modified vascular graft. *Mater. Sci. Eng. C* **84**, 1–11 (2018).
73. Wang, P. *Et al.* Interaction of gold nanoparticles with proteins and cells. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **16**, 034610 (2015).
74. Vroman, L. Effect of absorbed proteins on the wettability of hydrophilic and hydrophobic solids. *Nature* **196**, 476–477 (1962).

75. Moghimi, S. M. *Et al.* Material properties in complement activation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 1000–1007 (2011).
76. Sivaraman, B. & Latour, R. A. The Adherence of platelets to adsorbed albumin by receptor-mediated recognition of binding sites exposed by adsorption-induced unfolding. *Biomaterials* **31**, 1036–1044 (2010).
77. Godek, M. L., Michel, R., Chamberlain, L. M., Castner, D. G. & Grainger, D. W. Adsorbed serum albumin is permissive to macrophage attachment to perfluorocarbon polymer surfaces in culture. *J. Biomed. Mater. Res. A* **88A**, 503–519 (2009).
78. Vroman, L. Effect of adsorbed proteins on the wettability of hydrophilic and hydrophobic solids. *Nature* **196**, 476–477 (1962).
79. Ren, C., Nap, R. J. & Szleifer, I. The role of hydrogen bonding in tethered polymer layers. *J. Phys. Chem. B* **112**, 16238–16248 (2008).
80. Wörz, A., Berchtold, B., Moosmann, K., Prucker, O. & Rühle, J. Protein-resistant polymer surfaces. *J. Mater. Chem.* **22**, 19547 (2012).
81. Fang, F. & Szleifer, I. Controlled release of proteins from polymer-modified surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 5769–5774 (2006).
82. Pallotta, A. *Et al.* Analytical strategy for studying the formation and stability of multilayered films containing gold nanoparticles. *Anal. Bioanal. Chem.* (2021)
83. Sauerbrey, G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wagung dünner Schichten und zur Mikrowagung. *Z. Fur Phys.* **155**, 206–222 (1959).
84. Gérard, D. *Et al.* Evaluation of OSMOCELLS, a new semi-automatic device for osmotic fragility assessment. *Int. J. Lab. Hematol.* **39**, 521–527 (2017).
85. Membré, A., Wahl, D., Lecompte, T. & Regnault, V. Test de génération de thrombine La thrombinographie: Méthodologie. *Rev. Francoph. Lab.* **2007**, 37–43 (2007).
86. Lecut, C., Peters, P., Massion, P. B. & Gothot, A. Is there a place for thrombin generation assay in routine clinical laboratory? *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **73**, 137–149 (2015).
87. Back, S. A., Khan, R., Gan, X., Rosenberg, P. A. & Volpe, J. J. A new Alamar Blue viability assay to rapidly quantify oligodendrocyte death. *J. Neurosci. Methods* **91**, 47–54 (1999).
88. Pallotta, A., Philippe, V., Boudier, A., Leroy, P. & Clarot, I. Highly sensitive and simple liquid chromatography assay with ion-pairing extraction and visible detection for quantification of gold from nanoparticles. *Talanta* **179**, 307–311 (2018).
89. Parent, M. *Et al.* A Complete physicochemical identity card of s-nitrosoglutathione. 12.
90. Qian, Q., Nath, K. A., Wu, Y., Daoud, T. M. & Sethi, S. Hemolysis and acute kidney failure. *Am. J. Kidney Dis.* **56**, 780–784 (2010).
91. Weber, M. *Et al.* Blood-contacting biomaterials: in vitro evaluation of the hemocompatibility. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **6**, 99 (2018).
92. Spronk, H. M. H., Govers-Riemslog, J. W. P. & ten Cate, H. The blood coagulation system as a molecular machine. *Bioessays* **25**, 1220–1228 (2003).
93. Borissoff, J. I., Spronk, H. M. H., Heeneman, S. & ten Cate, H. Is thrombin a key player in the ‘coagulation-atherogenesis’ maze? *Cardiovasc. Res.* **82**, 392–403 (2009).
94. Mohammad, F. *Et al.* Adhesion of human blood platelets to glass and polymer surfaces. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* **3**, 257–270 (1974).

95. Lampugnani, M. G. & Dejana, E. Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 674–682 (1997).
96. Kevil, C. G., Payne, D. K., Mire, E. & Alexander, J. S. Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *J. Biol. Chem.* **273**, 15099–15103 (1998).
97. Carmeliet, P. *Et al.* Targeted deficiency or cytosolic truncation of the ve-cadherin gene in mice impairs vegf-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* **98**, 147–157 (1999).
98. Friebe, A. & Koesling, D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ. Res.* **93**, 96–105 (2003).
99. Fukuo, K. *Et al.* Nitric oxide mediates cytotoxicity and basic fibroblast growth factor release in cultured vascular smooth muscle cells. A possible mechanism of neovascularization in atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* **95**, 669–676 (1995).
100. Jones, M. L., Ganopolsky, J. G., Labbé, A., Wahl, C. & Prakash, S. Antimicrobial properties of nitric oxide and its application in antimicrobial formulations and medical devices. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**, 401–407 (2010).
101. Juedes, M. J. & Wogan, G. N. Peroxynitrite-induced mutation spectra of psp189 following replication in bacteria and in human cells. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **349**, 51–61 (1996).
102. Modak, J. M. & McCullough, L. D. Oxidative and nitrosative stress. In *Primer on Cerebrovascular Diseases* 240–246 (Elsevier, 2017).
1. Carpenter, A. W. & Schoenfisch, M. H. Nitric oxide release: Part II. Therapeutic applications. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 3742 (2012).

Annexes

Annexe 1 : Article 4 : Long-lasting and controlled antioxidant property of immobilized gold nanoparticles for intelligent packaging

L'article 4 représente une étude de l'activité antioxydante portée par les AuNP immobilisées par une monocouche de polycation

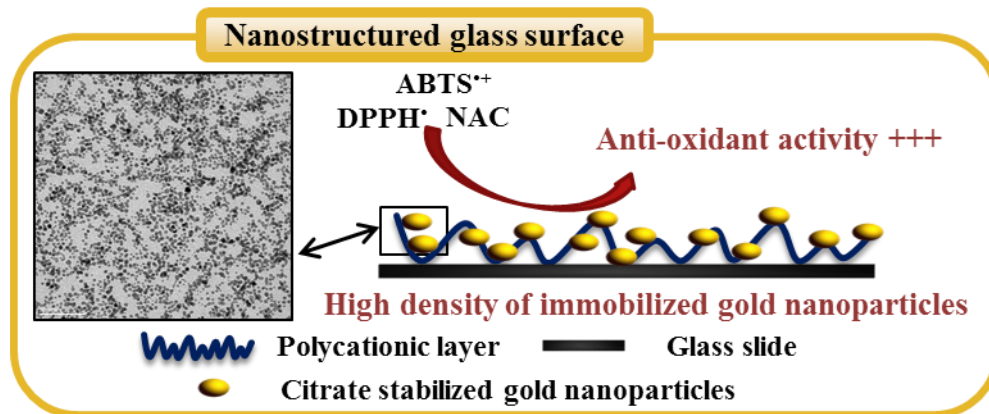
Cet article est issu d'une partie de mes résultats de stage de Master 2

Il a été publié dans le journal *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* (I.F. = 5,268).

Jordan Beurton, Igor Clarot, Julie Stein, Benjamin Creusot, Christophe Marcic, Eric Marchioni, A.Boudier

Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Volume 176, Pages 439-448 (2019)

Graphical Abstract :



Long-lasting and controlled antioxidant property of immobilized gold nanoparticles for intelligent packaging

J. Beurton¹, I. Clarot¹, J. Stein¹, B. Creusot¹, C. Marcic², E. Marchioni², A. Boudier^{1*}

¹ Université de Lorraine, CITHEFOR, F-54000 Nancy, France

² Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France

* Corresponding author.

Phone +33 372 747 228

ariane.boudier@univ-lorraine.fr

Highlights

- Nanostructured surfaces made of immobilized gold nanoparticles
- Short and long-lasting anti-oxidant capacity against free-radical species
- Enhancement of reduced thiol half-life
- High density of immobilized gold nanoparticles may form an intelligent packaging

Abstract

The development of new packaging able to preserve sensitive biomolecules against oxidative stress is an important field. Several studies refer to antioxidant properties carried out by colloidal gold nanoparticles (AuNP). Herein, the purpose was to check whether this property is preserved when AuNP are immobilized on a glass support. After nanostructured film preparation, the physicochemical characterization proved that AuNP were well-individualized in the films with a high density of immobilization. Two radicals: ABTS^{•+} and DPPH[•] were used to investigate their antioxidant capacity. The results showed that immobilized AuNP had a preserved antioxidant capacity characterized by a different kinetic: more controlled and more prolonged but with the same efficiency (vs the same quantity of colloidal AuNP). The AuNP films demonstrated a capacity to prevent from degradation a molecule containing a thiol function. A 10-fold increase of N-acetylcysteine half-life was measured using the immobilized AuNP, highlighting the interest of the developed and adaptable support.

Keywords: AuNP, nanostructured films, physicochemical characterization, antioxidant, radicals, storage

1. Introduction

Gold nanoparticles (AuNP) are nowadays part of the most developed and used nanomaterials because of their ease of synthesis and their characteristics which implies their numerous applications and their biocompatibility [1–3]. They are well defined by their physicochemical and optical properties which result from their structure. AuNP can be functionalized by biomolecules and drugs with important yield due to an important surface over volume ratio [2,4]. Numerous studies are describing the antioxidant properties of AuNP [5–7]. The particles can directly scavenge free radical species *via* catalytic reaction on their surface after adsorption of the molecule. This allows an interaction between the unpaired electron from the free radical and the conduction-band electron of the AuNP providing an enhanced antioxidant property [5]. They can also act as antioxidant delivery systems after drug grafting on their surface [7]. Gold nanoparticles were shown to increase the antioxidant potency of molecules such as Trolox®, the hydrophilic derivative of vitamin E [6], ascorbic acid [5] or reduced glutathione [4].

In parallel, food or cosmetic storage in daily life is an important domain of nanotechnology application through packaging and the related business is continually increasing [3,8].

Packaging is qualified by Samuelsson (2017) as:

- active: when it creates an inert barrier between food and the environment and reacts with the food product for extension of its preservation,
- intelligent or responsive: when it can detect, sense, record, trace, communicate, and apply a scientific interpretation to increase shelf life, enhance safety, improve quality, provide information, and warn about possible problems.

Oxidative stress is a main parameter to control in order to ensure a good storage of food and cosmetics. This may lead to a loss of nutrients, or the degradation of the interesting molecules in the case of cosmetics (antioxidant, lipids, ...), and to a generation of undesirable flavors or

even potentially toxic substances [9,10]. To replace phenolic antioxidant components that are questioned towards their potential toxicity such as for example butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT), other strategies must be developed [11]. In this way, some nanotechnologies are nowadays under investigation to be used in food processing and/or packaging to prevent oxidation of sensitive goods [3]. This intelligent packaging usually includes a matrix, based on cellulose or gelatin, combined with nanomaterials [11–13]. Despite their interesting antioxidant property, AuNP are poorly studied in this application. AuNP can be functionalized by several kinds of small molecules, polymers or even protein and antibodies [14–18] which can also facilitate their anchorage on the support [14,17]·[19]. However, few reports described the immobilization of AuNP on matrices to develop new packaging and authors only studied the antioxidant property of the material in a short-term issue [20,21].

In this work, a polymer film immobilizing a high density of AuNP was created and characterized. Its antioxidant property was studied according to short-term and long-term endpoints monitoring the kinetic in comparison to colloidal AuNP. The preservation of a molecule containing a thiol function was also tested as a proof of concept.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents and standards

All reagents and solvents were of analytic grade and used without further purification. KCl was purchased from Carl Roth. Citric acid and KH_2PO_4 were purchased from Labosi. Methanol and Na_2HPO_4 were purchased from Carlo Erba. $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, NaOH 30%, NaCl and HCl 1 M were purchased from VWR Chemicals. Phosphate buffer saline solution (PBS) was prepared as follows: $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 6.68 \times 10^{-3}$ M, $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 1.47 \times 10^{-3}$ M, $[\text{NaCl}] = 138.00 \times 10^{-3}$ M, and $[\text{KCl}] = 2.68 \times 10^{-3}$ M, final pH was adjusted to 7.4. Tris-HCl buffer was obtained by dissolving 18.16 g of Tris in 1 L of H_2O , pH was adjusted to pH = 7.4 with HCl 12 M. All other reagents were supplied by Sigma Aldrich. Ultrapure deionized water ($> 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) was used for the preparation of all solutions.

Poly(allylamine hydrochloride) powder (PAH) and branched poly(ethylene imine) (PEI) solution 50 % wt in water with average molecular masses of 17,500 and 80,000 respectively were purchased from Sigma Aldrich.

2.2. Synthesis of citrate-stabilized AuNP

Citrate stabilized AuNP were synthesized in aqueous solution according to our previous work [22]. Briefly, 1 mL of HAuCl_4 solution (10 mg/mL) was added into 90 mL of water and 2 mL of sodium citrate 55 mM was added under inert atmosphere. The solution was stirred for 1 min then 1 mL of NaBH_4 19.5 mM was added and the solution was stirred for 10 min under nitrogen. The pH of the resulting solution was 5.5. This synthesis provides a reaction yield of 99.6 ± 0.4 % [23]. Characteristics of the resulting colloidal gold nanoparticles were demonstrated reproducible and with a low polydispersity by our previous works [24]. The synthesis was stored in the dark at 4°C during a maximum period of 20 days [24]. All experiments involving

colloidal gold nanoparticles were carried out with this synthesis product without any further treatment.

2.3. Preparation of AuNP films

Borosilicate glass slides (24 x 36 mm) from Menzel-Gläser were immersed for 15 min and at 100°C in a solution of 0.1 M sodium dodecyl sulfate and then rinsed with distilled water before being immersed for 15 min and at 100°C in 0.1 M HCl solution and again rinsed with distilled water. Slides were then dried on an absorbent paper.

Polyallylamine hydrochloride and polyethyleneimine solutions were prepared at 0.1M of polymer in 10 mL of Tris-HCl buffer. The films were then made by soaking the slides in 10 ml of 0.1 M polyallylamine hydrochloride or polyethyleneimine solutions in Tris-HCl solution (10 min) and then in 10 ml of 0.15 M Tris-HCl buffer (3 min). Slides were then deposited successively in a bath of AuNP for 10 min and then in a bath of Tris-HCl buffer for 3 min. This cycle was repeated 15 times. The AuNP solutions were renewed every 5 deposits.

For Transmission Electron Microscopy (TEM), the films were deposited on carbon covered copper grids (Agar) using the previous protocol but decreasing the incubation time from 10 and 3 min to 3 and 1 min respectively. A washing of 1 min in water was added after the last bath of Tris-HCl buffer.

2.4. Gold quantification using an ion pairing HPLC-vis method

The dosage of the gold was performed according to the method developed by the laboratory [23,25]. Briefly, the gold nanoparticles were first oxidized (with the solution of HCl-NaCl-Br₂) to allow the formation of an ion pair between tetrachloroaurate anion and Rhodamine B.

Previous work proved that the oxidation of AuNP (Au(0)) was a total reaction and led to Au(III) ions[23]. This ion pair obtained was then extracted using an organic solvent and the corresponding Rhodamine B was quantified by HPLC/UV. In this study, glasses were crushed, rinsed in 1.0 mL of HCl-NaCl-Br₂ solution (1.000 M – 0.300 M – 0.025 M respectively), and stirred during 20 min (600 rpm). HPLC was carried out on a SpectraSystem system constituted by the following modules: vacuum degasser (SCM1000), quaternary pump (P1000XP), autosampler (AS300) and UV-visible detector (UV2000). The column (Nucleosil® C18, 150 mm × 4.6 mm, 3 μm particles size and 100 Å porosity) was thermostated at 40 °C using a Croco-cil (1267) oven. Data acquisition and injection control were performed by the Azur software (version 5.0, Datalys®). The isocratic mobile phase consisted on a binary mixture of acetonitrile and 0.1 % trifluoroacetic acid aqueous solution (25/75, V/V). The injection volume was 20 μL. The detector was set at a wavelength of 555 nm and the pump at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹.

2.5. Reduction of 2,2'-azino-di(3-ethylbenzathiazolin-6-sulfinate) by immobilized AuNP

An 2,2'-azino-di(3-ethylbenzathiazolin-6-sulfinate) (ABTS^{•+}) stock solution was prepared by dissolving 20 mg of ABTS in 6 mL of PBS and mixing this solution with 1 mL of 1.3 mM K₂S₂O₈ with an overnight incubation. An appropriate dilution of the solution (final concentration 6.7 mM) was operated just before its use ($\epsilon_{734\text{nm}} = 1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [22]. Antioxidant capacity of colloid and immobilized gold nanoparticles were compared by using ABTS^{•+}. For this purpose, the volume of colloidal AuNP containing the same number of nanoparticles to the one present on a slide was calculated. Glass Surface covered by the film is 8.64 cm². Quantification of gold nanoparticles on that part of the slide led to an immobilization density of 3.8×10^{13} AuNP/cm². So, one slide contains 3.2×10^{14} AuNP. Considering the Avogadro's number (6.022×10^{23}), this value corresponded to 5.3×10^{-10} moles of

nanoparticles. According to a concentration of 69.3×10^{-9} M of colloidal AuNP at the end of the synthesis, the corresponding volume was 7900 μ L. This calculation allowed the comparison of immobilized vs colloidal nanoparticles. The kinetic (t = 0, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 4, 5 and 6 h) of variation of ABTS^{•+} absorbance at 734 nm were studied in triplicate. The samples were placed in a water bath, in the dark, at a temperature of 37°C and a stirring of 50 rotations per min. In parallel, controls at the same dilution of ABTS^{•+} were realized as follow: with GSH (as a reference antioxidant positive control (ca. 5 mg,)) or with slides covered with only PAH film or uncovered slides. The negative control was realized with only ABTS^{•+} solution incubated in similar conditions.

To study the long-lasting reducing capacity of immobilized gold nanoparticles, the following protocol was performed. Several ABTS^{•+} reduction cycles (cycle of 6h) were repeated (12 times) on the same slides covered with 15 deposits according to the previous cited conditions. The slides were placed for several cycles of 6 hours under the same conditions with a fresh solution of ABTS^{•+} prepared as described above. The experiments were carried out in triplicate. Absorbances were measured at $\lambda = 734$ nm at t = 0 min and at t = 6 h for each cycle.

The difference in ABTS^{•+} concentration between negative controls and samples at the end of the 6 h cycle was calculated as:

$$\%Difference = \frac{([ABTS^{•+}control] - [ABTS^{•+}slide])}{[ABTS^{•+}control]} \times 100$$

Where [ABTS^{•+}control] is the concentration of ABTS^{•+} in negative controls and [ABTS^{•+}slide] is the concentration of ABTS^{•+} in samples with slides after 6 h.

2.6. Reduction of 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl by immobilized AuNP

The stock solutions of DPPH[•] and its reduced form DPPH₂ were prepared by dissolving 28 mg of DPPH[•] and DPPH₂ in 100 mL of methanol (71 μM). The working solutions were obtained by diluting the stock solutions by 10-fold in a methanol-10 mM citrate ammonium buffer pH 7.4 (60/40, V/V) according to [26] (this medium did not alter the AuNP film). To monitor at the same time both DPPH[•] and DPPH₂ concentrations, a separative method was used [26]. HPLC was carried out with similar chromatographic materials than in 2.4 except the isocratic mobile phase which consisted on a mixture of methanol and 10 mM citrate ammonium buffer pH = 7.4 (80/20, V/V). The column was thermostated at 40 °C using a Croco-cil oven and the injection volume was 100 μL. The detector was set at a wavelength 330 nm and the pump at a flow rate of 1.0 mL.min⁻¹. Data acquisition and injection control were performed by the Azur software (version 5.0, Datalys®).

The reduction of DPPH[•] into DPPH₂ by immobilized AuNP was studied in triplicate. The samples were placed in the dark and in a water bath at a temperature of 37°C and a stirring of 50 rotations per min. Chromatography analyses were performed at t = 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 and 5 h. In parallel, controls at the same dilution of DPPH[•] were realized as follow: with GSH (as a reference antioxidant positive control (*ca.* 5 mg,)) or with slides covered with only PAH film or uncovered slides. The negative control was realized with only DPPH[•] solution incubated in similar conditions.

2.7. N-acetylcysteine quantification

A 6.7 μM solution of N-acetylcysteine was prepared in Phosphate Buffered Saline (0.148 M; pH = 7.4). The ability to maintain N-acetylcysteine under its reduced state by immobilized AuNP was studied by soaking glass slides covered by AuNP films in 15 mL of N-acetylcysteine

solution during 24 h at 4 °C in the dark. The effect of AuNP quantity was also tested with films made by an increasing number (1, 3, 5, 10, and 15) of AuNP deposits. In parallel, a negative control of *N*-acetylcysteine in the same conditions was carried out. The remaining *N*-acetylcysteine concentration in the dipping solution at t = 0, 2, 4, 6 and 24 h was determined using Ellman's method. Briefly, 100 µL of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic) acid solution (1 mM in Phosphate Buffered Saline 0.148 M; pH = 7.4) were added to 500 µL of each sample. This mixture was incubated 10 min at room temperature protected from light then absorbances were read at $\lambda = 412$ nm. *N*-acetylcysteine concentrations were calculated using a calibration curve obtained with a standard reduced glutathione solution diluted in Phosphate Buffered Saline (0.148 M; pH = 7.4) in the range of 3 to 10 µM.

A first-order rate law was considered for the calculation of the constant of kinetic using:

$$C = C_0 e^{-kt}$$

in which C is the concentration of *N*-acetylcysteine at a time t, C_0 the initial concentration and k the constant of kinetic.

The half-life was calculated using:

$$T_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k}$$

In which $T_{1/2}$ is the half-life of *N*-acetylcysteine and k the constant of kinetic.

2.8. Nanoparticle characterization

Colloidal gold nanoparticles were characterized after synthesis without any dilution step.

UV–vis spectrophotometer (UV-1800 Shimadzu) was used for spectra recordings and absorbance measurements. Molar absorbance value for AuNP was $\epsilon = 1.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [25]. The hydrodynamic diameter (D_h) and zeta potential (ζ) of AuNP were measured at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). Transmission Electron Microscopy (TEM) images were recorded using a Philips CM20 instrument with a LaB_6 cathode at 200 kV. DigitalMicrograph software was used to determine AuNP core diameters by measuring 200 individualized nanoparticles. Energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) was performed on a part of a grid.

3. Results and Discussion

3.1. Colloidal AuNP

Gold nanoparticles were synthesized according to a previously validated protocol [24]. Their physicochemical characterization was performed and results are presented in Figure 1. The spectroscopic properties of the particles showed a Localized Surface Plasmon Resonance (λ_{max}) at 514 nm without any other peak meaning no aggregation [27]. This parameter is specific to metallic nanoparticles and gives information on their size, their form, their environment in terms of medium, and neighbor particularly the inter-nanoparticle distance [28]. Hydrodynamic and core diameters were respectively 6.5 and 2.7 nm. The difference between those 2 dimensions represents the stabilization and the solvation layers. The charge surface was negative which was explained by the presence of citrate ions used as capping agents of AuNP. The assay and concentration were conform to our previously published results [22,25,29].

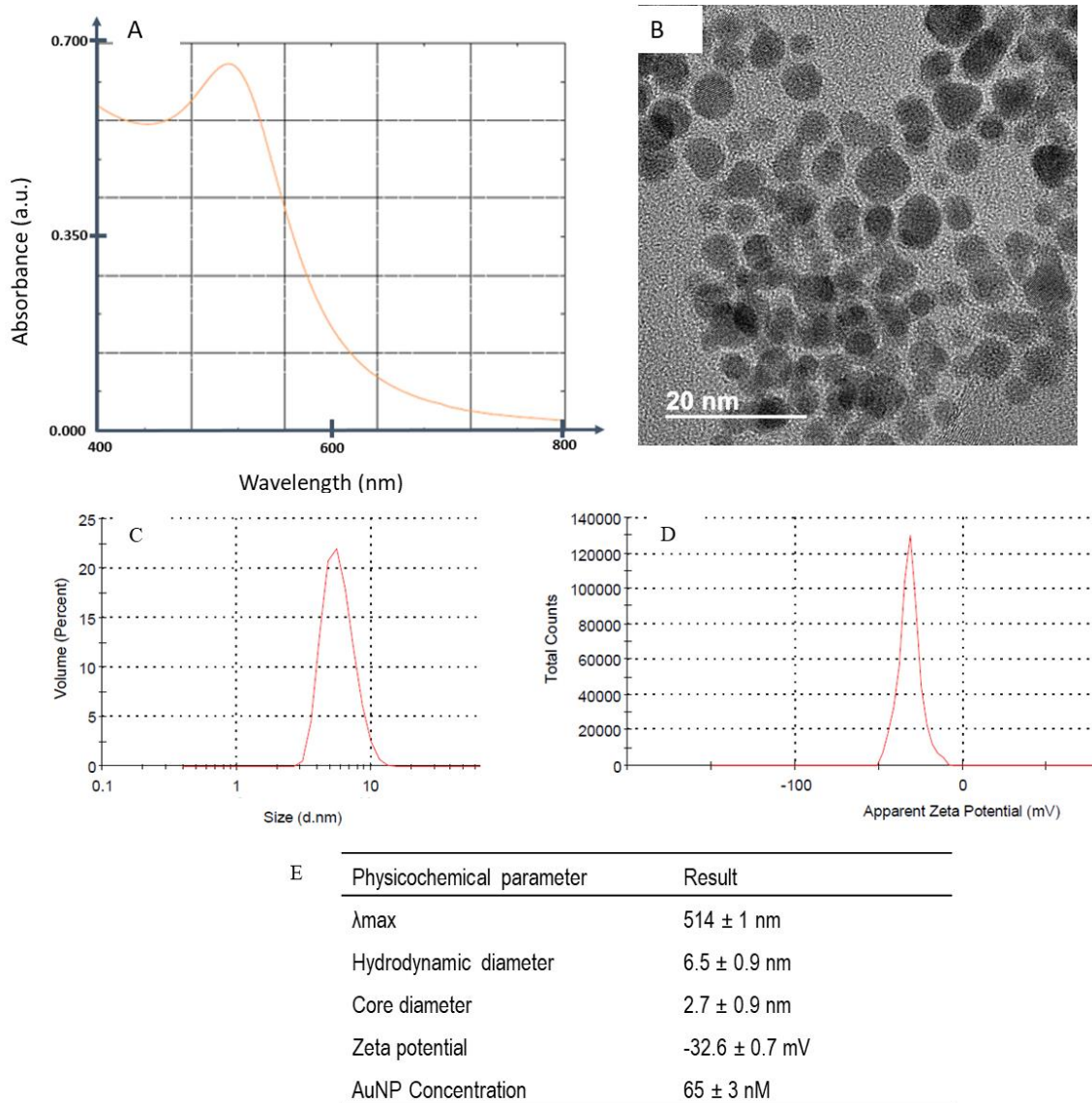


Figure 1. Physicochemical characterization of colloidal AuNP using (A) spectrophotometry, (B) TEM, (C) Dynamic Light Scattering, (D) Laser Doppler Electrophoresis and the whole results (E).

3.2. Characterization of films containing immobilized AuNP

Films immobilizing AuNP were prepared by soaking baths through electrostatic interactions [30]. After glass cleaning, and thanks to the negatively charges (silanol groups) present on the glass surface, a monolayer of a polycation (polyallylamine, ionization constant, $pK_a = 8.7$ [31]) was first deposited to create a positively charged surface in order to successively anchor the negatively charged particles, up to 15 deposits.

The created films were fully characterized using spectrophotometry, TEM equipped with EDS and a method to quantify gold. The corresponding results are shown in Figure 2 and 3. The spectroscopic results highlighted the presence of the Localized Surface Plasmon Resonance confirming the signature of AuNP which were observed in TEM (Figure 2A and 3A). EDS study was performed on a part of a TEM grid and the corresponding elemental analysis is shown in Figure 3C. Three main elements were found: nitrogen which comes from the polymer containing a primary amine, oxygen which comes from citrate ions of AuNP capping, and gold. The value of Localized Surface Plasmon Resonance increased as the deposits (Figure 2B), proving the modification of the AuNP environment (increase in the number of neighbors and decrease of the distance between particles, as shown by TEM images) and not in size, as the particles were well-individualized (Figure 3B), nor in aggregation as seen in Figure 2B [27]. The value of Localized Surface Plasmon Resonance was almost stable after the 8th deposit demonstrating that the nanostructuration was globally homogeneous on the whole surface. The quantity of immobilized AuNP linearly increased (Figure 2C) and after the last deposit, the AuNP density was 3.8×10^{13} AuNP/cm² using an ion pairing HPLC-vis method [23]. The obtained density on a surface of 8.64 cm² corresponded to the quantity of particles contained into 8 mL of colloidal AuNP after synthesis. This highlighted the very important concentration of AuNP on the surface of the material and was in correlation with other studies [19,32]. The

density of AuNP immobilization can be easily adapted as a function of the targeted application by either the number of baths of AuNP suspension or by the coated surface.

Some optimizations were performed to improve the AuNP density but did not lead to a better quantity of immobilized AuNP. Thus, the choice of polycation was tested: polyallylamine bearing one primary amine per monomer *vs* branched polyethylenimine bearing 4 primary amines, 3 secondary amines and 4 tertiary amines. At physiological pH (7.4) only two of them are ionized[33]. The number of polyallylamine layers initially deposited was increased from 1 to 3. However, neither the modification of polymer nor the increase in polycation layers initially deposited, improved the AuNP density. The standard deviation of the absorbance of those surfaces at the end of the construction was about 7 %.

The stability of the films was tested according to their spectroscopic properties. After 3 months, no significant modification was noticed in terms of absorbance (less than 0.016 a.u. of difference at the end of the study). Altogether, these results proved the nanostructuration of the support with a very important density of immobilized AuNP with good stability as a function of time.

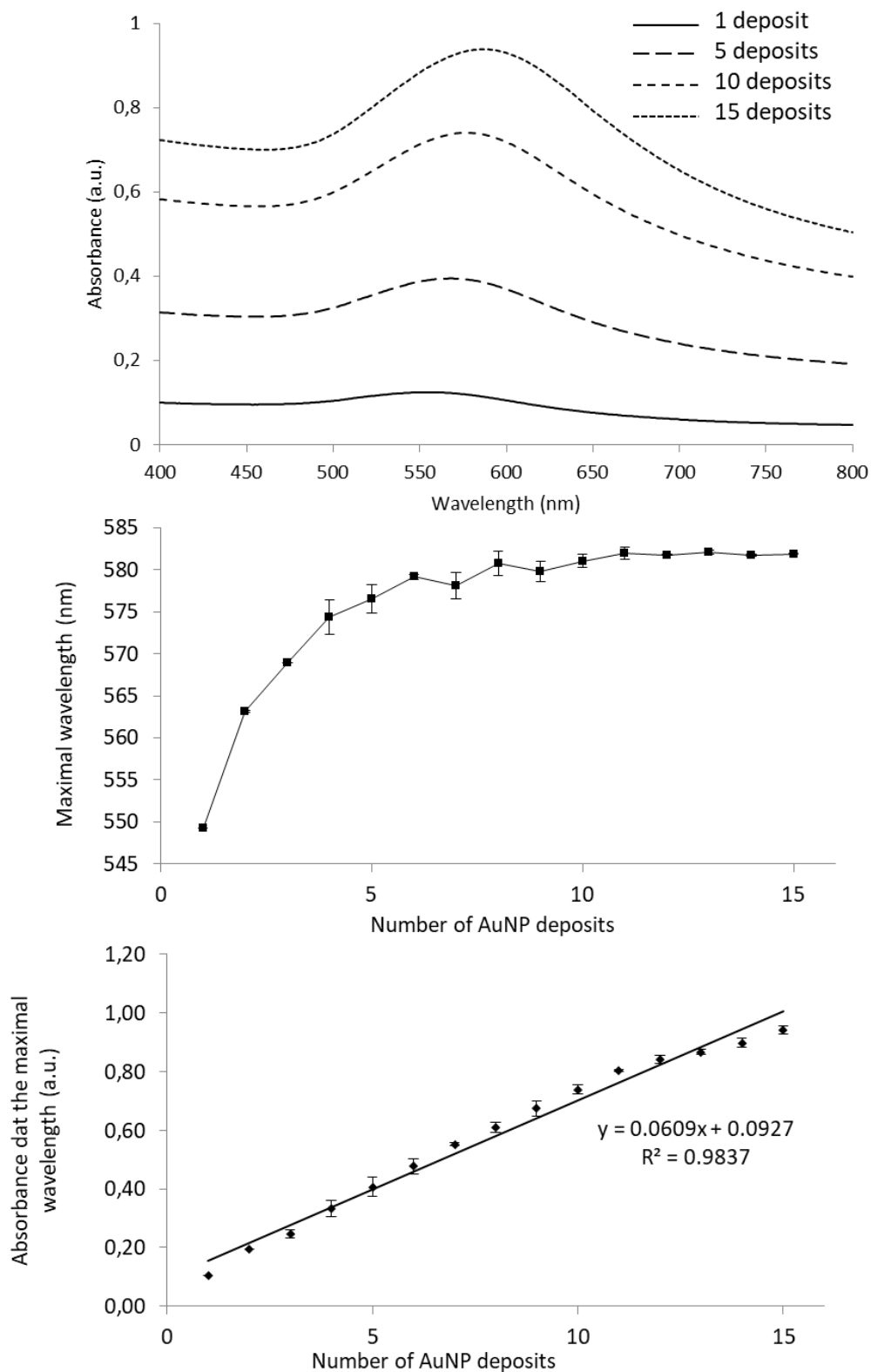


Figure 2. Spectral properties of AuNP film using spectrophotometry (A) monitoring the maximal wavelength (B) and the related absorbance (C) as a function of the number of AuNP baths ($n = 3$).

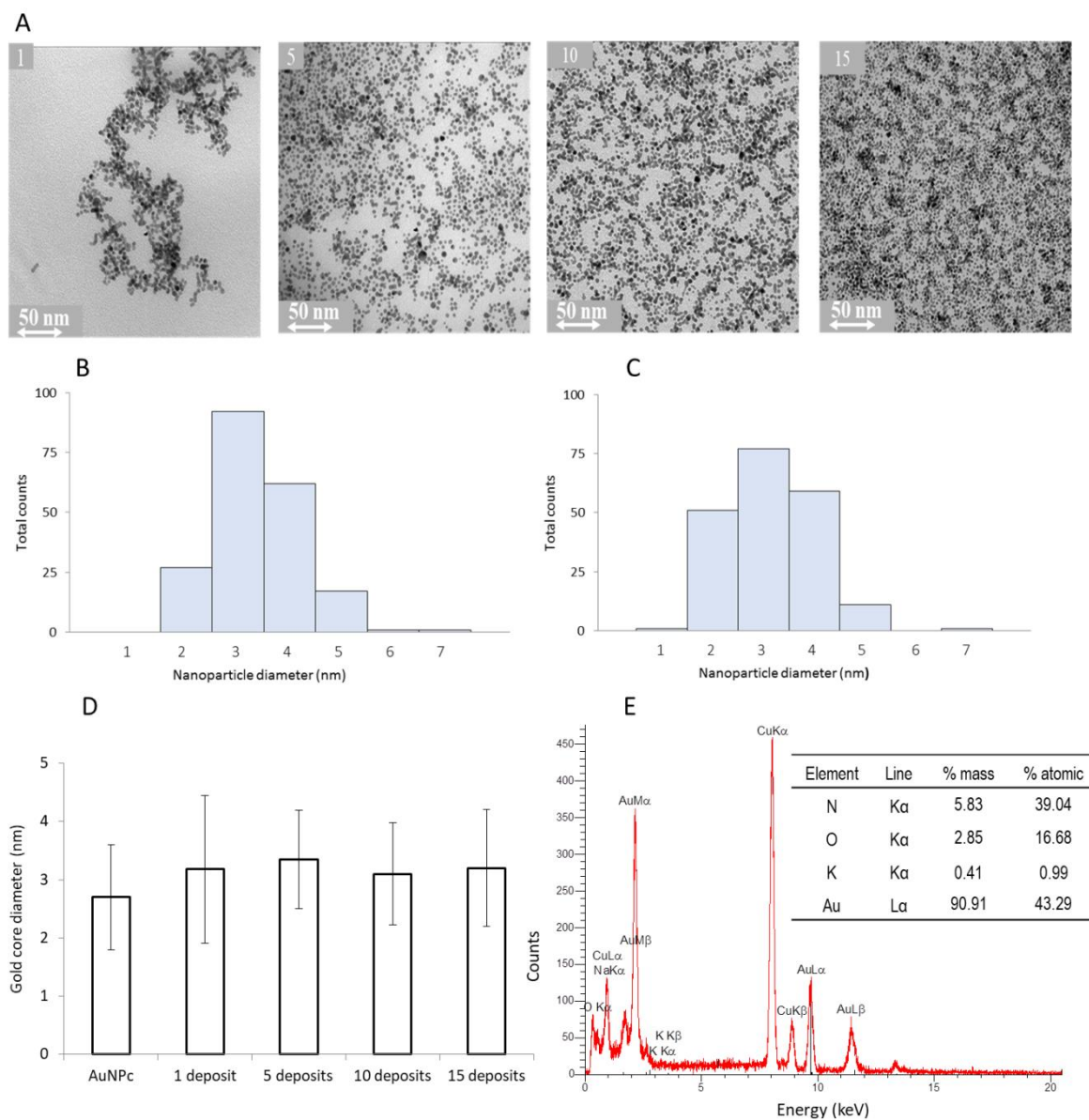


Figure 3. Characterization of films containing immobilized AuNP. Observations by TEM of films after 1, 5, 10 and 15 deposits of AuNP (A), distribution of gold core diameters ($n = 200$) for 5 (B) and 10 (C) deposits of AuNP, the mean measurement of gold core diameters (D) ($n = 200$) and EDS analysis on a film of 10 AuNP deposits (E).

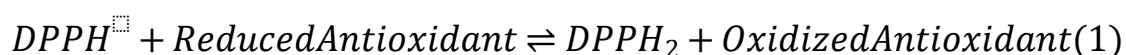
3.3. Antioxidant property of the nanostructured film

Antioxidant activity of AuNP is well-described in the literature [6,22,29,34]. However, to the best of our knowledge, the antioxidant activity of AuNP when they are immobilized on a support remains poorly studied [20,21].

The developed nanostructured material was tested using two molecules: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]) and 2,2'-azino-di(3-ethylbenzathiazolin-6-sulfinate) (ABTS^{•+}). These two classical antioxidant tests are based on the reduction of radical monitored by either spectrophotometry or HPLC-vis [26,35]. The performances of the support were evaluated in short-term and long-term endpoints.

3.3.1. Short-term effect

As far as the DPPH[•] test is concerned, the AuNP immobilized films showed an antioxidant property as shown by the radical reduction (Figure 4A) parallel to a production of DPPH₂, the hydrogenated product of the reaction (Figure 4B), according to equation:



This effect was only due to AuNP since glass and glass covered by the polycation did not have any effect. After 5 h of incubation, the percentages of DPPH[•] reduction by the glass (73.6 +/- 3.2 %,.) and by the glass covered by polycation (77.6 +/-0.3 %) were like the negative control (75.6 +/- 0.1 %). In parallel, the percentages of DPPH₂ production after 5 h by the glass (35.0 +/- 1.8 %), by the glass covered by polycation (32.7 +/- 0.4 %) were both similar than the negative control (30.0 +/- 0.3 %) and corresponded to the low stability of the radical in solution. The effect of immobilized AuNP was as important as the one obtained by an excess of reduced

glutathione but the kinetic was more gradual using the nanostructured material. The capacity of DPPH[•] reduction by immobilized AuNP was already proven in the literature after 3 h but without any kinetic considered [21].

The ABTS^{•+} test was realized, and the results are presented in Figure 4C. The data showed the antioxidant property of immobilized AuNP. Again, this was only due to the presence of nanoparticles (the concentration of ABTS^{•+} reduction after 6 h by glass (5.0 +/- 0.1 μ M), by glass covered by the polycation (4.0 +/- 0.9 μ M) were in the same range than the negative control (4.9 +/- 0.1 μ M)). When comparing immobilized AuNP to colloidal AuNP at the same nanoparticle quantity, two elements were interesting. First, both nanoparticle systems (immobilized and colloidal) demonstrated the same efficacy towards ABTS^{•+} reduction with a very residual concentration (*ca* 1 μ M) of the radical remaining after 6 h. Second, the kinetic of the antioxidant reaction was totally different when one compares colloidal AuNP to immobilized ones. This phenomenon was described for other AuNP contained into thin films, but the reaction was performed on model reactions (borohydride reduction of 4-nitrophenol and reaction between potassium ferricyanide and sodium thiosulfate) and not on radical species [20]. Moreover, in the cited work, the film performance was studied only up to *ca* 20 min *vs* 6 h, and also 3 days (*vide infra*) herein.

Our results proved that the reaction induced by immobilized AuNP was progressive and more controlled as a function of the time. Particle immobilisation induces a limitation in Brownian motion compared to colloidal AuNP which can freely move into the solution. In parallel, the polarization of the electronic cloud on the surface of the gold atoms induced by the electrostatic interaction with the polymer may lead to particles less sensitive to redox-reactions.

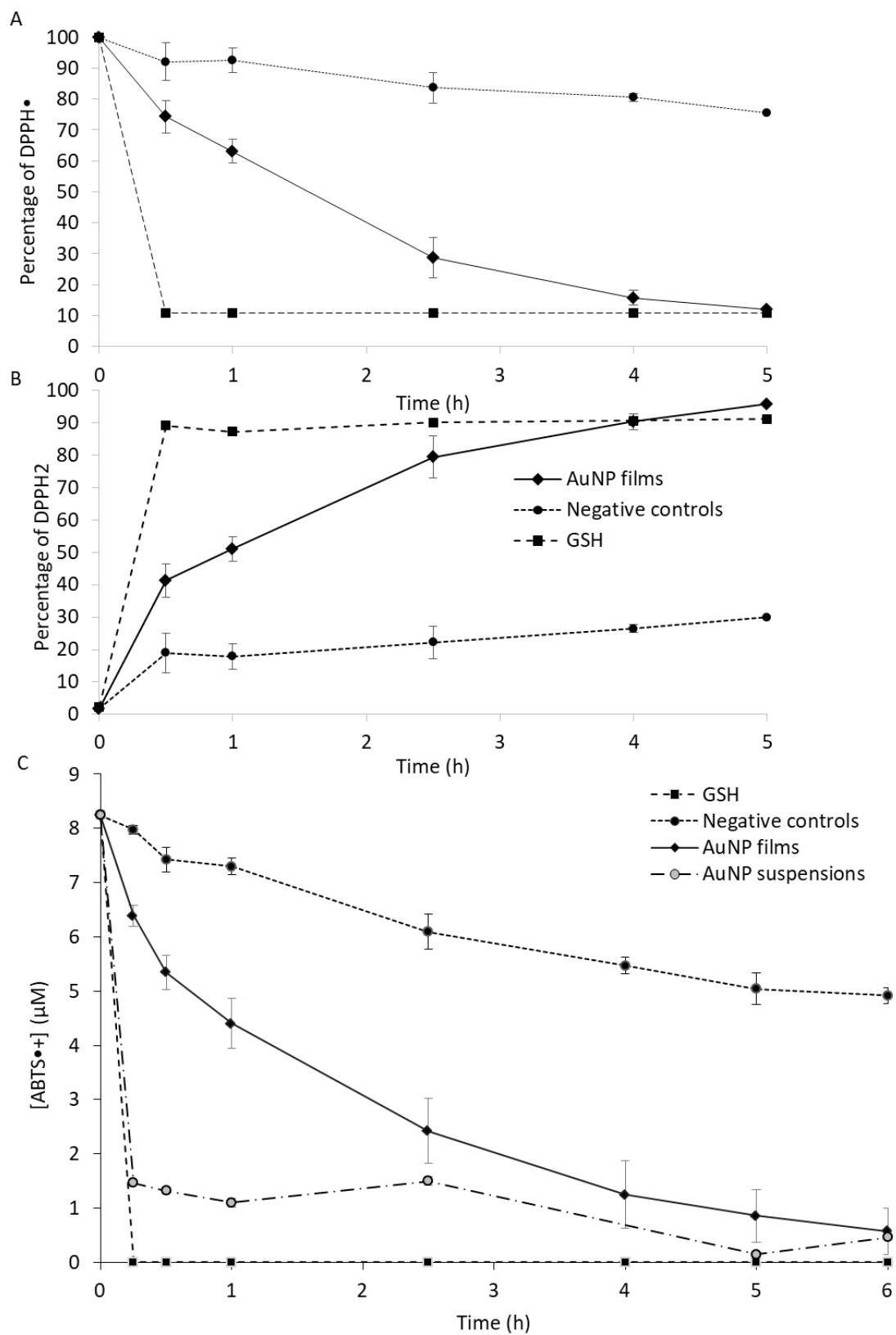


Figure 4. Antioxidant capacity of AuNP films using the DPPH[•]: ((A) monitoring of DPPH[•] disappearance and (B) DPPH₂ appearance) and ABTS^{•+} (C) tests (n=3).

3.3.2. Long-term effect

In a second set of experiments, ABTS^{•+} reduction by immobilized AuNP was studied with a more long-term endpoint (up to 3 days). The radical solution was replaced by a fresh one every 6 h which corresponded to the almost total reduction of the radical as previously observed in Figure 4. The long-term antioxidant effect of immobilized AuNP is illustrated by Figure 5. The obtained data showed a prolonged efficiency up to 3 days. The antioxidant effect was more important within the 12 h of experiments. Afterwards, the antioxidant property of immobilized AuNP was more progressive. The long-lasting antioxidant property of immobilized AuNP has never been described, to the best of our knowledge. However, other developed packaging proved a longer effect. A poly(lactic acid)-based nanocomposite was able to release butylhydroquinone and to have an antioxidant effect up to 6 months [11]. Gelatine films incorporated tea polyphenol nanoparticles proved the pharmacological effect up to 6 weeks [13]. In this study, the developed nanostructured materials demonstrated a shorter effect. However, our paper describes a pilot study and the materials can be adapted (coated surface, number of deposited AuNP) to reach industrial specifications for food or cosmetic matrix preservation.

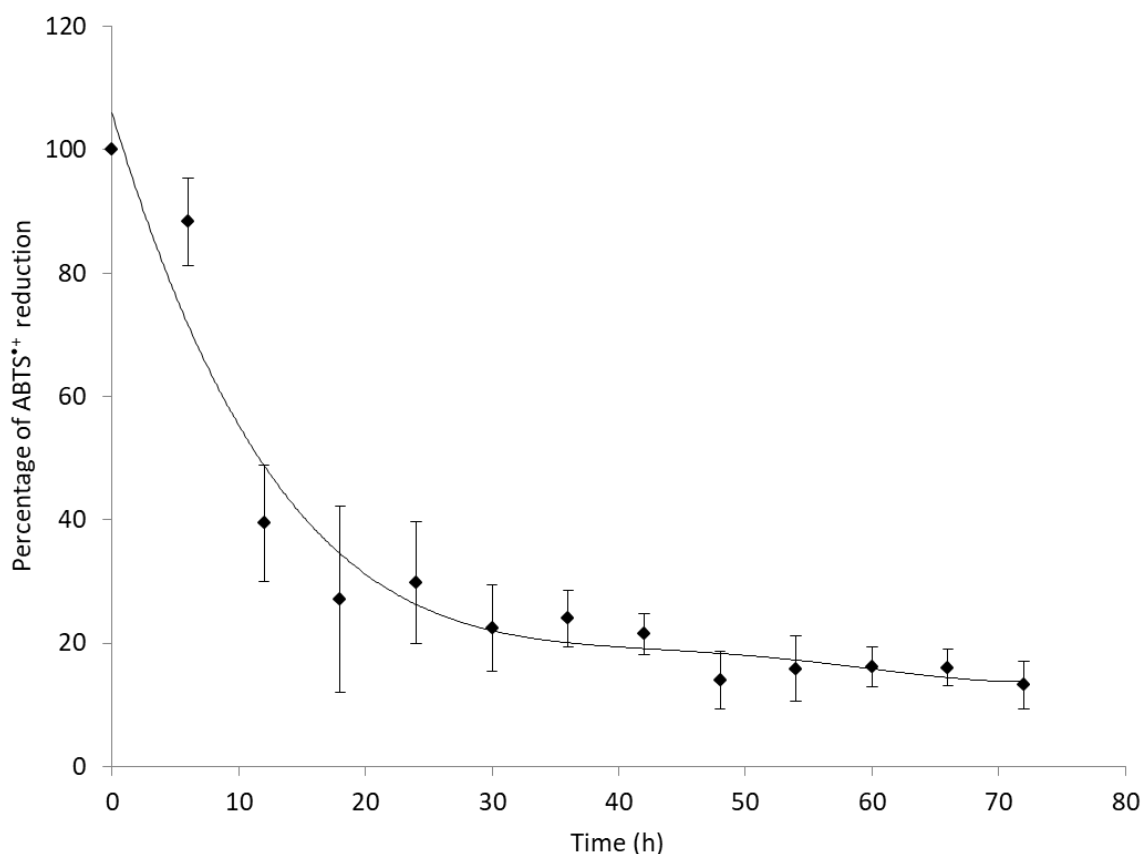
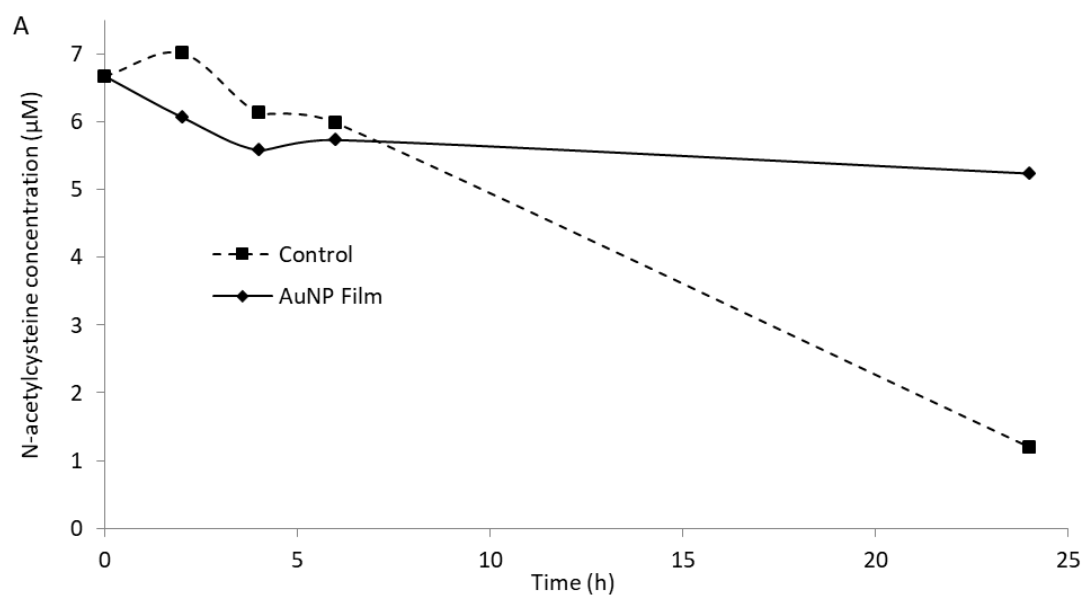


Figure 5. Long-lasting reducing capacity of immobilized AuNP by the evaluation of ABTS^{•+} reduction (the ABTS^{•+} solution was replaced by a fresh solution every 6 hours) (n = 3).

3.3.3. Effect on the storage of a molecule containing a reduced thiol function

Thiols with a cysteine residue are frequently found in food industry. For example in wine, molecules with reduced thiol function (*e.g.* glutathione, *N*-acetylcysteine) are known to preserve other aromatic thiol compounds from oxidation [36]. Improving the stability of a molecule with a thiol function under its reduced state could be a way to maintain quality of food products as a function of the time. In this way, a solution of *N*-acetylcysteine in conditions (neutral pH) that can quickly induce an oxidation was studied using a film immobilizing AuNP (Figure 6). Immobilized AuNP induced the persistence of *N*-acetylcysteine compared to the

control (78.5 % vs 18.0 %, respectively). In parallel, the effect of the number of baths and consequently the quantity of immobilized AuNP was studied according to the capacity to preserve this molecule. Figure 6 shows the modelled parameters of kinetic of degradation hypothesizing a first-order rate law for this reaction. The obtained values demonstrated the more AuNP were deposited, the less important were the constant of kinetic meaning a less rapid degradation process. More interestingly, the half-life of *N*-acetylcysteine was increased by a nearly 10-fold factor when comparing the control vs AuNP immobilized film with 15 deposits. This highlighted both the efficiency and adaptability of the system in a future application as intelligent packaging.



B

	Number of AuNP bath	Percentage of <i>N</i> -acetylcysteine remaining after 24 h	Kinetic constant (h^{-1})	Half-life (h)
<i>N</i> -acetylcysteine	-	18.0	0.0770	9.0
AuNP Film	1	43.4	0.0373	18.6
	3	50.9	0.0289	24.0
	5	56.7	0.0239	29.0
	10	67.2	0.0161	43.1
	15	78.5	0.0083	83,5

Figure 6. Antioxidant capacity of AuNP films (15 deposits) on a solution of N-acetylcysteine (A) and percentage of N-acetylcysteine and kinetic parameters of the degradation reaction as a function of the number of AuNP baths (first-order rate law at 4°C) (B).

4. Conclusion

In this paper, AuNP were immobilized on glass through electrostatic interactions. These films showed well-individualized particles with preserved spectroscopic properties. The nanostructured material revealed an antioxidant effect with a similar efficiency but different kinetic (more progressive) than colloidal AuNP. This effect was also prolonged as a function of time. Considering the adaptability of the developed prototypes (covered surface, number of AuNP deposited), the stability of the films and the long-lasting antioxidant capacity of the nanostructured material, this study laid the bases for a further development of innovative intelligent packaging to preserve biomolecules or sensitive molecules against oxidative stress in different domains such as food or cosmetics.

Declarations of interest: none

5. References

- [1] N. Elahi, M. Kamali, M.H. Baghersad, Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review, *Talanta*. 184 (2018) 537–556. doi:10.1016/j.talanta.2018.02.088.
- [2] M.C. Daniel, D. Astruc, Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology, *Chem. Rev.* 104 (2004) 293–346. doi:10.1021/cr030698+.
- [3] M. Samuelsson, *Nanomaterials in Daily Life: Compounds, Synthesis, Processing and Commercialization*, Springer, 2017, Chapter 2.
- [4] M. Luo, A. Boudier, I. Clarot, P. Maincent, R. Schneider, P. Leroy, Gold Nanoparticles Grafted by Reduced Glutathione With Thiol Function Preservation, *Colloid Interface Sci. Commun.* 14 (2016) 8–12. doi:10.1016/j.colcom.2016.07.002.
- [5] H. Razzaq, F. Saira, A. Yaqub, R. Qureshi, M. Mumtaz, S. Saleemi, Interaction of gold nanoparticles with free radicals and their role in enhancing the scavenging activity of ascorbic acid, *J. Photochem. Photobiol. B-Biology*. 161 (2016) 266–272. doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.04.003.
- [6] Z. Nie, K.J. Liu, C.-J. Zhong, L.-F. Wang, Y. Yang, Q. Tian, Y. Liu, Enhanced radical scavenging activity by antioxidant-functionalized gold nanoparticles: A novel inspiration for development of new artificial antioxidants, *Free Radic. Biol. Med.* 43 (2007) 1243–1254. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.011.
- [7] J. Tournebize, A. Sapin-Minet, G. Bartosz, P. Leroy, A. Boudier, Pitfalls of assays devoted to evaluation of oxidative stress induced by inorganic nanoparticles, *Talanta*. 116 (2013) 753–763. doi:10.1016/j.talanta.2013.07.077.
- [8] N. Bumbudsanpharoke, S. Ko, Nano-Food Packaging: An Overview of Market, Migration Research, and Safety Regulations, *J. Food Sci.* 80 (2015) R910–R923. doi:10.1111/1750-3841.12861.
- [9] C.S. Yang, C.-T. Ho, J. Zhang, X. Wan, K. Zhang, J. Lim, Antioxidants: Differing Meanings in Food Science and Health Science, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 3063–3068. doi:10.1021/acs.jafc.7b05830.
- [10] M.E. Yonny, A.R. Torresi, C. Cuyamendous, G. Reversat, C. Oger, J.-M. Galano, T. Durand, C. Vigor, M.A. Nazareno, Thermal Stress in Melon Plants: Phytoprostanes and Phytofurans as Oxidative Stress Biomarkers and the Effect of Antioxidant Supplementation, *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 8296–8304. doi:10.1021/acs.jafc.6b03011.
- [11] H. Almasi, B. Ghanbarzadeh, J. Dehghannya, A.A. Entezami, A.K. Asl, Development of a novel controlled-release nanocomposite based on poly(lactic acid) to increase the oxidative stability of soybean oil, *Food Addit. Contam. Part a-Chemistry Anal. Control*

- Expo. Risk Assess. 31 (2014) 1586–1597. doi:10.1080/19440049.2014.935962.
- [12] P. Sonkaew, A. Sane, P. Suppakul, Antioxidant Activities of Curcumin and Ascorbyl Dipalmitate Nanoparticles and Their Activities after Incorporation into Cellulose-Based Packaging Films, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 5388–5399. doi:10.1021/jf301311g.
- [13] F. Liu, J. Antoniou, Y. Li, J. Yi, W. Yokoyama, J. Ma, F. Zhong, Preparation of Gelatin Films Incorporated with Tea Polyphenol Nanoparticles for Enhancing Controlled-Release Antioxidant Properties, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 3987–3995. doi:10.1021/acs.jafc.5b00003.
- [14] P. Samadi Pakchin, H. Ghanbari, R. Saber, Y. Omid, Electrochemical immunosensor based on chitosan-gold nanoparticle/carbon nanotube as a platform and lactate oxidase as a label for detection of CA125 oncomarker, *Biosens. Bioelectron.* 122 (2018) 68–74. doi:10.1016/j.bios.2018.09.016.
- [15] I. Venditti, T.F. Hassanein, I. Fratoddi, L. Fontana, C. Battocchio, F. Rinaldi, M. Carafa, C. Marianecchi, M. Diociaiuti, E. Agostinelli, C. Cametti, M.V. Russo, Bioconjugation of gold-polymer core-shell nanoparticles with bovine serum amine oxidase for biomedical applications, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 134 (2015) 314–321. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.06.052.
- [16] E. Czechowska, K. Ranoszek-Soliwoda, E. Tomaszewska, A. Pudlarz, G. Celichowski, D. Gralak-Zwolenik, J. Szemraj, J. Grobelny, Comparison of the antioxidant activity of catalase immobilized on gold nanoparticles via specific and non-specific adsorption, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 171 (2018) 707–714. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.07.036.
- [17] S. Raeisi, A. Molaeirad, M. Sadri, H.R. Nejad, Detection of Anti-tetanus Toxoid Monoclonal Antibody by Using Modified Polycarbonate Surface, *Plasmonics.* 13 (2018) 1555–1567. doi:10.1007/s11468-017-0664-4.
- [18] I. Venditti, G. Testa, F. Sciubba, L. Carlini, F. Porcaro, C. Meneghini, S. Mobilio, C. Battocchio, I. Fratoddi, Hydrophilic Metal Nanoparticles Functionalized by 2-Diethylaminoethanethiol: A Close Look at the Metal-Ligand Interaction and Interface Chemical Structure, *J. Phys. Chem. C.* 121 (2017) 8002–8013. doi:10.1021/acs.jpcc.7b01424.
- [19] A. Pallotta, M. Parent, I. Clarot, M. Luo, V. Borr, P. Dan, V. Decot, P. Menu, R. Safar, O. Joubert, P. Leroy, A. Boudier, Blood Compatibility of Multilayered Polyelectrolyte Films Containing Immobilized Gold Nanoparticles, *Part. Part. Syst. Charact.* 34 (2017) 1600184. doi:10.1002/ppsc.201600184.
- [20] M. Biswas, E. Dinda, M.H. Rashid, T.K. Mandal, Correlation between catalytic activity and surface ligands of monolayer protected gold nanoparticles, *J. Colloid Interface Sci.* 368 (2012) 77–85. doi:10.1016/j.jcis.2011.10.078.
- [21] N. Bumbudsanpharoke, S. Ko, The green fabrication, characterization and evaluation of catalytic antioxidation of gold nanoparticle-lignocellulose composite papers for active

- packaging, *Int. J. Biol. Macromol.* 107 (2018) 1782–1791. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.10.046.
- [22] J. Tournebize, A. Boudier, O. Joubert, H. Eidi, G. Bartosz, P. Maincent, P. Leroy, A. Sapin-Minet, Impact of gold nanoparticle coating on redox homeostasis, *Int. J. Pharm.* 438 (2012) 107–116. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.07.026.
- [23] A. Pallotta, V. Philippe, A. Boudier, P. Leroy, I. Clarot, Highly sensitive and simple liquid chromatography assay with ion-pairing extraction and visible detection for quantification of gold from nanoparticles, *Talanta.* 179 (2018) 307–311. doi:10.1016/j.talanta.2017.11.016.
- [24] A. Pallotta, A. Boudier, P. Leroy, I. Clarot, Characterization and stability of gold nanoparticles depending on their surface chemistry: Contribution of capillary zone electrophoresis to a quality control, *J. Chromatogr. A.* 1461 (2016) 179–184. doi:10.1016/j.chroma.2016.07.031.
- [25] J. Tournebize, A. Sapin-Minet, R. Schneider, A. Boudier, P. Maincent, P. Leroy, Simple spectrophotometric method for quantitative determination of gold in nanoparticles, *Talanta.* 83 (2011) 1780–1783. doi:10.1016/j.talanta.2010.12.005.
- [26] A. Boudier, J. Tournebize, G. Bartosz, S. El Hani, R. Bengueddour, A. Sapin-Minet, P. Leroy, High-performance liquid chromatographic method to evaluate the hydrogen atom transfer during reaction between 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical and antioxidants, *Anal. Chim. Acta.* 711 (2012) 97–106. doi:10.1016/j.aca.2011.10.063.
- [27] K. Kim, H. Ryoo, Y.M. Lee, K.S. Shin, Adsorption characteristics of Au nanoparticles onto poly(4-vinylpyridine) surface revealed by QCM, AFM, UV/vis, and Raman scattering spectroscopy, *J. Colloid Interface Sci.* 342 (2010) 479–484. doi:10.1016/j.jcis.2009.10.019.
- [28] Z.M. Qi, I. Honma, M. Ichihara, H.S. Zhou, Layer-by-layer fabrication and characterization of gold-nanoparticle/myoglobin nanocomposite films, *Adv. Funct. Mater.* 16 (2006) 377–386. doi:10.1002/adfm.200500450.
- [29] J. Tournebize, A. Boudier, A. Sapin-Minet, P. Maincent, P. Leroy, R. Schneider, Role of Gold Nanoparticles Capping Density on Stability and Surface Reactivity to Design Drug Delivery Platforms, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 4 (2012) 5790–5799. doi:10.1021/am3012752.
- [30] Z. Tang, Y. Wang, P. Podsiadlo, N.A. Kotov, Biomedical applications of layer-by-layer assembly: From biomimetics to tissue engineering, *Adv. Mater.* 18 (2006) 3203–3224. doi:10.1002/adma.200600113.
- [31] A.I. Petrov, A.A. Antipov, G.B. Sukhorukov, Base–Acid Equilibria in Polyelectrolyte Systems: From Weak Polyelectrolytes to Interpolyelectrolyte Complexes and Multilayered Polyelectrolyte Shells, *Macromolecules.* 36 (2003) 10079–10086. doi:10.1021/ma034516p.

- [32] D.M. Dotzauer, J. Dai, L. Sun, M.L. Bruening, Catalytic membranes prepared using layer-by-layer adsorption of polyelectrolyte/metal nanoparticle films in porous supports, *Nano Lett.* 6 (2006) 2268–2272. doi:10.1021/nl061700q.
- [33] R. Burgess, Use of Polyethyleneimine in Purification of Dna-Binding Proteins, *Methods Enzymol.* 208 (1991) 3–10. doi:10.1016/0076-6879(91)08003-Z.
- [34] A. Tułodziecka, A. Szydłowska-Czerniak, Development of a novel gold nanoparticle-based method to determine antioxidant capacity of Brassica oilseeds, white flakes and meal, *Food Chem.* 208 (2016) 142–149. doi:10.1016/j.foodchem.2016.03.105.
- [35] R. Van der Werf, S. Dal, J. Le Grandois, D. Aoude-Werner, F. Digel, S. Ennahar, S. Sigrist, E. Marchioni, Determination of active radical scavenging compounds in polar fruit and vegetable extracts by an on-line HPLC method, *Lwt-Food Sci. Technol.* 62 (2015) 152–159. doi:10.1016/j.lwt.2015.01.004.
- [36] I.G. Roussis, D. Papadopoulou, M. Sakarellos-Daitsiotis, Protective Effect of Thiols on Wine Aroma Volatiles, *Open Food Sci. J.* 3 (2010) 98–102. doi:10.2174/1874256400903010098.

Optimisation physico-chimique de films fonctionnalisés pour des applications cardiovasculaires

Les dispositifs médicaux implantables (DMI) dédiés au système cardiovasculaire tels que les stents sont associés sur le long terme à un risque élevé de thrombose et/ou de resténose. Ces complications sont dues à des lésions endothéliales, à l'adsorption de protéines ou à la coagulation qui conduisent à l'occlusion du vaisseau. Dans ce contexte physiopathologique, le monoxyde d'azote (NO), un médiateur physiologique participant à l'homéostasie vasculaire, joue un rôle clé. L'objectif de ce projet repose sur le développement d'un revêtement de surface du DMI libérant NO sur une longue durée pour améliorer sa tolérance vasculaire et limiter la survenue des effets secondaires. Pour cela, un film multicouche alternant des polymères cationiques et anioniques et des nanoparticules d'or (AuNP) fonctionnalisées par des donneurs de NO de type *S*-nitrosothiols (RSNO) est développé, depuis la phase de fonctionnalisation de la surface jusqu'à son évaluation biologique en termes de biocompatibilité. Le chapitre 1 offre une revue de la littérature sur la création de biomatériaux présentant une activité biologique *via* la libération ou la génération de NO. Cette synthèse permet de sélectionner une stratégie de fonctionnalisation des surfaces au regard de l'effet thérapeutique attendu. Le chapitre 2 est dédié à l'aspect réservoir en NO. Il définit les conditions de construction des films multicouches permettant de concilier l'enrichissement en AuNP et la stabilité du film ainsi que les stratégies de fonctionnalisation par le NO. Le chapitre 3 se concentre sur l'interaction entre les films multicouches et le compartiment sanguin. L'hémocompatibilité de la surface est renforcée par l'ajout de poly(éthylène glycol) (PEG) créant une interface non hémolytique, non cytotoxique, antithrombotique et limitant l'adsorption protéique. Ainsi, l'ensemble de ces travaux identifie de nouvelles stratégies pour établir un revêtement actif et hémocompatible sur la surface de DMI.

Mots clés : Film multicouche, polyélectrolytes, nanoparticules d'or, monoxyde d'azote, hémocompatibilité

Physicochemical optimization of functionalized films for cardiovascular purpose

Implantable medical devices (IMD) dedicated to the cardiovascular system, such as stents, are associated with a high long-term risk of thrombosis and/or restenosis. These complications are due to endothelial lesions, protein adsorption or coagulation leading to vessel occlusion. In this physiopathological context, nitric oxide (NO), an endogenous mediator involved in vascular homeostasis, plays a key role. The aim of this project is to develop a surface coating on the IMD that releases NO on a long-term period to improve its vascular tolerance and limit the occurrence of side effects. For this purpose, a multilayered film alternating cationic and anionic polymers and gold nanoparticles (AuNPs) functionalized by *S*-nitrosothiol (RSNO) NO donors is developed, from the surface functionalization to its biological evaluation in terms of biocompatibility. Chapter 1 provides a review of the literature on the creation of biomaterials with biological activity through the release or generation of NO. This review allows the selection of a surface functionalization strategy in relation to the expected therapeutic effect. Chapter 2 is dedicated to the NO reservoir and it defines the conditions of construction of multilayered films combining the enrichment in AuNP and the stability of the film as well as the strategies of functionalization by NO. The chapter 3 focuses on the interaction between multilayer films and the blood compartment. The hemocompatibility of the surface is enhanced by the addition of poly(ethylene glycol) (PEG) creating a non-hemolytic, non-cytotoxic, antithrombotic interface and limiting protein adsorption. Thus, all these works define the strategy for creating an active and hemocompatible coating applicable to a cardiovascular IMD.

Key words: multilayered film, polyelectrolyte, gold nanoparticles, nitric oxide, blood compatibility