

Remerciements

Tout d'abord, je tenais à remercier mon directeur de thèse, le Docteur Philippe Laval de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer cette thèse au sein du laboratoire UMR_S 1121 « Biomatériaux et Bioingénierie » à la suite de mon stage de fin d'étude. Merci Philippe pour ta confiance, ta disponibilité, ton écoute et tous les conseils bienveillants que tu as pu m'apporter au cours de ces trois années.

J'aimerais remercier le directeur du laboratoire, le Professeur Pierre Schaaf de m'avoir permis d'effectuer mon stage de fin d'étude dans le laboratoire.

Je voudrais également remercier chaleureusement les membres du jury, la Professeure Ariane Boudier, le Docteur Vincent Humblot, la Docteure Cécile Formosa-Dague ainsi que le Professeur Loïc Jierry. Merci d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse.

Un grand merci au Docteure Varvara Gribova de m'avoir accueillie et appris tant de choses lors de mon stage. Merci pour ta confiance ainsi que pour tes encouragements qui m'ont beaucoup aidée lorsque je me posais mille et une questions sur le fait de faire une thèse. Je suis ravie d'avoir pu travailler et commencer mon travail de recherche avec toi.

Merci également à Cynthia Calligaro pour toutes les réponses à mes questions. Tu as toujours trouvé du temps pour me répondre avec gentillesse et pédagogie. Je suis contente de t'avoir rencontrée et d'avoir pu partager de nombreux moments avec toi.

Je souhaiterais également remercier le Docteur Nihal Engin Vrana pour tous ses conseils ainsi que pour l'opportunité que tu m'as offerte avec Philippe de participer au projet BioTune et ainsi passer ces deux mois en Malaisie. Cette expérience a été très enrichissante pour moi et restera longtemps gravée dans ma mémoire. J'en profite pour remercier l'équipe du Docteur Siti Hawa Ngalim de l'Université Sains Malaysia pour leur accueil et leur bienveillance.

Merci au Docteur Bernard Senger pour ses cours de statistiques mais également pour tous ses conseils sur la rédaction de cette thèse. Je souhaite aussi remercier le Docteur Benoît Frisch de m'avoir accueillie de manière intempestive sur le site de la faculté de Pharmacie afin que je puisse effectuer quelques expériences, mais aussi pour les différents spectres RMN.

J'aimerais remercier le Docteur Florent Barbault du laboratoire ITODYS de Paris pour la collaboration sur les peptides MAP et pour son très beau travail sur la modélisation moléculaire. Merci également au Docteur Yves Nominé pour les expériences de dichroïsme circulaire.

Je souhaite également remercier tous mes collègues du laboratoire U1121 mais aussi de Spartha Medical et de l'équipe du Docteur Benoit Frisch pour ces bons moments passés au cours de ces trois ans. Je n'oublierai pas les différentes sorties comme le canoë ou encore les discussions et débats endiablés de la pause midi. Spéciale dédicace au bureau D532 (ou récemment renommé Batcave). Merci Adrien, Benjamin, Inès, Claire et Lorène de m'avoir supportée, je suis heureuse d'avoir pu partager ce bureau avec vous.

Merci à tous mes amis, notamment ceux rencontrés en école d'ingénieur qui ont su être là pour m'écouter et me soutenir de loin.

Je terminerai par remercier ma famille, notamment mes parents qui m'ont toujours soutenue au cours de mes études et m'ont permis de toujours pouvoir faire mes propres choix. Je ne serais pas là sans vous et vos encouragements. Enfin, un grand merci à Clément pour son soutien à toute épreuve malgré mes nombreux moments de doute. Tu as été d'un grand réconfort de chaque instant.

Table des matières

Remerciements.....	1
Liste des abréviations.....	9
Liste des figures et tableaux.....	12
Liste des publications et des communications orales.....	18
Introduction générale.....	19
Bibliographie.....	21
 Chapitre 1. Etat de l'art.....	 25
1.1. Introduction générale sur les peptides antimicrobiens	27
1.2. Un peptide antimicrobien naturel : la ϵ-poly(L-lysine) (ϵ-PLL) et son utilisation dans le développement de biomatériaux	30
1.2.1. Abstract	30
1.2.2. Introduction	30
1.2.3. Properties of ϵ-PLL	34
1.2.3.1. Antifungal properties.....	34
1.2.3.2. Antibacterial properties	35
1.2.3.3. Elucidation of the antibacterial and antifungal mechanisms	36
1.2.4. Encapsulation of ϵ-PLL.....	39
1.2.4.1. Micro- and nanoparticles	39
1.2.4.2. Nanofibers	41
1.2.4.2. Hydrogels and films	42
1.2.5. Coating surfaces with ϵ-PLL	44
1.2.5.1. Coating of nanoparticles	44
1.2.5.2. Coating of metals.....	48
1.2.5.3. Coating of polymers.....	49
1.2.6. ϵ-PLL for hydrogel synthesis	51
1.2.6.1. Hydrogels based on Schiff base	51
1.2.6.2. Mussel-inspired adhesives and hydrogels	53

1.2.6.3. Carbodiimide chemistry between ϵ -PLL and fatty acids	55
1.2.6.4. ϵ -PLL/chitosan hydrogels.....	56
1.2.6.5. Enzymatically crosslinked ϵ -PLL hydrogels.....	57
1.2.6.6. ϵ -PLL hydrogels based on electrostatic interactions	57
1.2.6.7. Dual network hydrogels containing ϵ -PLL	58
1.2.6.8. Other hydrogel systems	59
1.2.7. Conclusion and perspectives	60
1.2.8. Supporting information	60
1.3. Les hydrogels, biomatériaux prometteurs.....	62
1.3.1. Informations générales sur les hydrogels.....	62
1.3.2. Hydrogels antimicrobiens pour des applications de cicatrisation tissulaire ...	64
1.3.3. Les hydrogels « intelligents »	65
1.4. Conclusion et perspectives	66
Bibliographie	68

Chapitre 2. Matériels et Méthodes.....79

2.1. Matériels.....	83
2.1.1. Les « Multiple Antigenic Peptides » de poly(L-arginine).....	83
2.1.2. Matériels utilisés lors de la synthèse des hydrogels ϵ -PLL / PEGDA.....	84
2.1.3. Matériels utilisés lors de la synthèse des hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal.....	85
2.1.4. Les solutions tampons et les milieux de culture	87
2.2. Formation des hydrogels.....	88
2.2.1. Les hydrogels de ϵ -PLL / PEGDA.....	88
2.2.2. Les hydrogels tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal ...	91
2.3. Tests de microbiologie.....	93
2.3.1. Concentration minimale inhibitrice	93
2.3.2. Activité antibactérienne : test direct et en extrait	94
2.3.2.1. Activité antibactérienne directe	93

2.3.2.2. Activité antibactérienne des extraits.....	94
2.3.3. Cinétique de la lyse des bactéries	95
2.4. Tests de culture cellulaire.....	96
2.4.1. Tests de cytotoxicité.....	96
2.4.1.1. Cytotoxicité directe	97
2.4.1.2. Cytotoxicité en extrait	97
2.4.2. Quantification du monoxyde d'azote (NO) libéré par les macrophages	98
2.4.3. Suivi de la migration cellulaire : modèle de cicatrisation	99
2.4.4. Hémolyse des globules rouges en présence de peptides en solution.....	101
2.5. Microscope confocal	102
2.5.1. Principe de fonctionnement	102
2.5.2. Marquage des bactéries à la surface de l'hydrogel	103
2.5.3. Mobilité des chaînes de ϵ -PLL par FRAP	104
2.6. Rhéologie : temps de gel et module élastique	107
2.7. Taux de gonflement et de dégradation	107
2.7.1. Mesure du taux de gonflement des hydrogels.....	108
2.7.2. Mesure du taux de dégradation	108
2.8. Test d'interaction peptide-LPS	109
2.9. Suivi de la libération du polypeptide clivable par la GluC	110
Bibliographie	111
Chapitre 3. Etude de l'influence de peptides branchés « MAP » à base d'arginines sur les propriétés antibactériennes	113
3.1. Introduction.....	116
3.2. Les propriétés antibactériennes des peptides ramifiés « MAP » : étude <i>in vitro</i> et modélisation moléculaire	117
3.2.1. Abstract	117
3.2.2. Introduction	118
3.2.3. Materials and methods	121

3.2.3.1. Materials.....	121
3.2.3.2. Methods.....	121
3.2.4. Results.....	123
3.2.4.1. Antimicrobial properties of peptides	124
3.2.4.2. Biocompatibility of the peptides	128
3.2.4.3. Computational studies	131
3.2.5. Conclusion and perspectives	136
3.3. Résultats complémentaires	137
3.3.1. Préparation des revêtements pour les tests <i>in vitro</i>	140
3.3.2. Adsorption du peptide dans la multicouche PAR30 / HA.....	140
3.3.3. Etude de l'activité antibactérienne des multicouches sur <i>S. aureus</i>	143
3.3.4. Etude de la cytotoxicité des revêtements sur des cellules fibroblastes	145
3.4. Conclusion.....	146
Bibliographie	148
Figures complémentaires.....	151
Chapitre 4. Hydrogels antimicrobiens à base de poly(éthylène glycol) diacrylate et de ϵ-poly(L-lysine) pour la cicatrisation de plaies.....	155
4.1. Introduction	159
4.1.1. Choix des polymères	159
4.2. Hydrogels de poly(éthylène glycol) diacrylate et de ϵ-PLL aux propriétés antimicrobiennes intrinsèques.....	160
4.2.1. Abstract	161
4.2.2. Introduction	161
4.2.3. Materials and Methods	164
4.2.3.1. Materials.....	164
4.2.3.2. Preparation of hydrogels.....	164
4.2.3.3. Rheological properties	165
4.2.3.4. Degradation property and swelling properties.....	165

4.2.3.5. Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of ϵ -PLL	166
4.2.3.6. Antibacterial properties	166
4.2.3.7. Cytotoxic concentration of ϵ -PLL	167
4.2.3.8. In vitro cytotoxicity test.....	167
4.2.3.9. Evaluation of the pro- and anti-inflammatory properties of the extracted hydrogels	168
4.2.3.10. Antifungal properties of hydrogels.....	169
4.2.3.11. In vivo experiment	169
4.2.3.12. Statistical analysis	170
4.2.4. Results and discussion	171
4.2.4.1. Hydrogels formation	171
4.2.4.2. Rheological properties	172
4.2.4.3. Swelling percentage and degradation properties	173
4.2.4.4. MIC of ϵ -PLL determination	174
4.2.4.5. Antibacterial properties on Gram-positive and Gram-negative bacteria	175
4.2.4.6. Antibacterial activity of the degradation products of hydrogels.....	178
4.2.4.7. Determination of the cytotoxic concentration of ϵ -PLL.....	179
4.2.4.8. Biocompatibility.....	179
4.2.4.9. Antifungal activity of hydrogels	181
4.2.4.10. In vivo experiments.....	187
4.2.5. Conclusion	190
4.3. Résultats complémentaires	191
4.3.1. Réduction des fonctions acrylates par le TCEP	191
4.3.2. Mobilité des chaînes de ϵ -PLL dans le gel	193
4.3.3. Dosage des amines primaires dans les hydrogels.....	195
4.3.4. Evaluation de la capacité de migration de cellules au sein d'une « blessure » en présence d'extraits d'hydrogels	197
Références.....	201
Figures complémentaires	204

Chapitre 5. Hydrogels antibactériens « intelligents » à base de poly(éthylène glycol) thiol et de poly(éthylène glycol) maléimide	207
5.1. Introduction	210
5.1.1. Les revêtements antibactériens « intelligents »	210
5.1.2. Les hydrogels d'acide hyaluronique chargés	211
5.1.3. Les hydrogels de HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal.....	211
5.2. Résultats préliminaires	212
5.2.1. Etude de la déprotection du thiol de la cystéine par un réducteur.....	213
5.2.2. Concentration minimale inhibitrice du polypeptide FITC-PAR10-PC-SH.....	214
5.2.3. Préparation des hydrogels tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal	216
5.2.4. Etude de la FITC-PAR10 libérée des hydrogels par mesure de la fluorescence	217
5.2.5. Activité antibactérienne des hydrogels	221
5.2.5.1. Activité antibactérienne directe des hydrogels	222
5.2.5.2. Activité antibactérienne des hydrogels extraits avec et sans ajout de GluC dans le milieu d'extraction	223
5.2.5.3. Chargement de ϵ -PLL dans les hydrogels	224
5.3. Conclusion du chapitre.....	227
Bibliographie	230
Conclusion générale et perspectives.....	231

Liste des abréviations

(PAR30 / HA)_x	multicouche de x bicouches de poly(L-arginine) de 30 arginines et d'acide hyaluronique
ε-PLL	ε-poly(L-lysine)
ε-PLL/PEGDA-x	hydrogels de ε-poly(L-lysine) et de poly(éthylène glycol) diacrylate possédant un ratio amine / acrylate de x
AMPs	peptides antimicrobiens
BHI	bouillon cœur-cervelle
Bodipy	Bodipy TR-cadavérine
BSA	Albumine de sérum bovin
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CMI	concentration minimale inhibitrice
CTC	chlorure de 5-cyano-2,3-ditoly de tétrazolium
Cyclo(R10)	poly(L-arginine) cyclique de 10 arginines
DABCYL	acide 4-((4-diméthylamino)phényl)azo)benzoïque
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	diméthylsulfoxyde
DO	densité optique
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EDANS	5-((2-aminoéthyl)amino)naphtalène-1-sulfonique
FBS	Sérum de veau fœtal
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
FRAP	Recouvrement de la Fluorescence après Photoblanchiment
FRET	transfert d'énergie par résonance Förster
G'	module élastique
G''	module visqueux
GluC	protéase à sérine V8
HA	acide hyaluronique
HS-PEG-SH	poly(éthylène glycol) dithiol
HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal	hydrogel à base de poly(éthylène glycol) dithiol et de poly(éthylène glycol) tétramaléimide

IL-4	interleukine 4
LCST	« Lower Critical Solution Temperature »
LPS	lipopolysaccharides
MAP	« Multiple Antigenic Peptide »
MDCK	cellules épithéliales Madin-Darby Canine Kidney
MEB	Microscope électronique à balayage
MHB	Milieu de culture Mueller-Hinton
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
MTT	(bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)
Mw	Masse molaire
NaCl	chlorure de sodium
NaOH	hydroxyde de sodium
NED	N-naphtyl-éthylènediamine
NO	monoxide d'azote
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAH	poly(hydrochlorure d'allylamine)
PAR	poly(L-arginine)
PAR10	poly(L-arginine) de 10 arginines
PAR20	poly(L-arginine) de 20 arginines
PAR30	poly(L-arginine) de 30 arginines
PAR100	poly(L-arginine) de 100 arginines
PAR200	poly(L-arginine) de 200 arginines
PBS	tampon phosphate salin
PC	peptide clivable de séquence TLRGGEC
PEG	poly(éthylène glycol)
PEGDA	poly(éthylène glycol) diacrylate
PEGDA / ϵ-PLL	hydrogels à base de poly(éthylène glycol) diacrylate et de ϵ -poly(L-lysine)
PEGDMA	poly(ethylene glycol) dimethacrylate
PFA	paraformaldéhyde
PNC	peptide non clivable de séquence TLRGGGK
PS	pénicilline-streptomycine
R5MAP4	polymère branché possédant 4 bras de 5 arginines

R8MAP4	polymère branché possédant 4 bras de 8 arginines
R5MAP8	polymère branché possédant 8 bras de 5 arginines
R8MAP8	polymère branché possédant 8 bras de 8 arginines
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAB	milieu de culture Sabouraud
TCEP	(tris(2-carboxyéthyl)phosphine)
TEM	microscope électronique à transmission
Tetra-PEG-SH	poly(éthylène glycol) 4 bras fonctionnalisé de 4 thiols
Tetra-PEG-Mal	poly(éthylène glycol) 4 bras fonctionnalisé de 4 maléimides
tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal	hydrogel à base de poly(éthylène glycol) tétrathiol et poly(éthylène glycol) tétramaléimide
FITC-PAR10-PC-SH	polypeptide contenant un peptide antibactérien lié à une sonde fluorescente et une séquence clivable (PC = TLRGEC)
Tris	tris-(hydroxyméthylaminométhane)
Tris / NaCl	tampon Tris 10 mM / NaCl 0.15 M à pH 7.4
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Liste des figures et tableaux

Figure 1.1. Nombre de publications contenant le terme « poly epsilon lysine » entre 1961 et 2022.....	32
Figure 1.2. Aperçu des différentes propriétés de la ϵ -poly(L-lysine) et de ses utilisations dans le développement de biomatériaux.....	33
Figure 1.3. Mécanisme d'action de la ϵ -poly(L-lysine) sur les champignons.....	35
Figure 1.4. Mécanisme d'action de la ϵ -poly(L-lysine) sur la membrane de <i>E. coli</i>	36
Figure 1.5. Image MEB et TEM de la morphologie et de la structure de <i>A. alternate</i> traité avec ϵ -poly(L-lysine)	39
Figure 1.6. Schéma représentant le développement et le mécanisme d'action d'hydrogels à base de ϵ -poly(L-lysine), de chitosan et de PEG 4 bras.....	43
Figure 1.7. Revêtement multicouche de poly(éthylène imine), d'acide poly(acrylique), de poly(hexaméthylène) biguanidine et de ϵ -poly(L-lysine).....	49
Figure 1.8. Développement d'un hydrogel de PEG aldéhyde et de ϵ -poly(L-lysine) par formation d'une base de Schiff.....	53
Figure 1.9. Représentation schématique du développement d'un hydrogel de ϵ -poly(L-lysine), dopamine et de chitosan pour des applications de cicatrisation.....	55
Figure 1.10. Représentation du développement d'un hydrogel contenant un double réseau à base de ϵ -poly(L-lysine) méthacrylate et d'acide tannique en présence d'un photoinitiateur...	59
Figure 2.1. Mécanisme d'une addition de Michael entre des chaînes de PEGDA et un nucléophile (A). Mécanisme de la réaction dans la synthèse de l'hydrogel ϵ -PLL / PEGDA (B).....	89
Figure 2.2. Structure interne de l'hydrogel HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal + FITC-PAR20-PC-SH.....	92
Figure 2.3. Protocole utilisé pour l'étude de l'activité antimicrobienne des hydrogels en direct (A) et en extrait (B).....	95
Figure 2.4. Schéma réactionnel de la réaction avec le réactif de Griess pour le dosage des ions NO_2^-	98
Figure 2.5. Suivi de la migration cellulaire dans les μ -dish au vidéomicroscope pour l'étude des propriétés cicatrisantes.....	101

Figure 2.6. Principe de fonctionnement du microscope confocal à fluorescence.....	103
Figure 2.7. Principe de fonctionnement d'une analyse par recouvrement de la fluorescence après photoblanchiment (FRAP).....	105
Figure 2.8. Plaque bi-puits conçu par Karim Benmlih utilisée pour les tests de suivi de libération du peptide par fluorescence.....	110
Figure 3.1. Formules développées des différents peptides d'arginines étudiés.....	120
Figure 3.2. Concentration minimale inhibitrice des peptides d'arginine sur <i>S. aureus</i> et <i>P. aeruginosa</i>	125
Figure 3.3. Evolution du nombre de colonies de <i>S. aureus</i> au cours du temps en présence de R20, R5MAP4 ou R8MAP8.....	127
Figure 3.4. Interaction entre le LPS de la membrane bactérienne de <i>E. coli</i> et les peptides PAR20, R5MAP4 et R8MAP8.....	128
Figure 3.5. Activité métabolique des cellules BALB/3T3 (A) et RAW264.7 (B) traitées pendant 24 h avec différentes concentrations de peptides R20, R5MAP4 et R8MAP8.....	129
Figure 3.6. Quantité du NO sécrété par les RAW264.7 après 24 h de traitement avec PAR20, R5MAP4 et R8MAP8 en présence ou non de LPS.....	130
Figure 3.7. Pourcentage d'hémolyse des globules rouges après traitement avec différentes concentrations de R20, R5MAP4 et R8MAP8.....	131
Figure 3.8. Distribution du rayon de giration de PAR20, R5MAP4 et R8MAP8	132
Figure 3.9. Paramètre d'ordre de la bicouche lipidique sans et avec les peptides R20, R5MAP4 et R8MAP8.....	135
Figure 3.10. Interaction structurale de PAR20, R5MAP4 et R8MAP8 avec les membranes de <i>S. aureus</i> et <i>P. aeruginosa</i>	136
Figure 3.11. Principe de la construction de revêtements multicouches de polyélectrolytes (A). Schéma de la multicouche formée sur lamelles de verre de 12 mm.....	139
Figure 3.12. Suivi de la différence de fréquence de résonance de la 3 ^{ème} harmonique au cours du temps par QCM lors des dépôts successifs des polyélectrolytes.....	143
Figure 3.13. Croissance bactérienne de <i>S. aureus</i> normalisée après 24 h en contact de multicouches avec en dernière couche PAR20 ou R5MAP4.....	145

Figure 3.14. Activité métabolique des BALB/3T3 après 24 h de culture dans du milieu de culture dans lequel les revêtements (PAR30 / HA) ₁₂ + PAR20 ou R5MAP4 ont été extraits...	146
Figure S3.1. Schéma moléculaire des phospholipides de la membrane de <i>P. aeruginosa</i> ...	151
Figure S3.2. Pourcentage d'hémolyse après traitement des peptides à différentes concentrations en μM	152
Figure S3.3. Evolution de l'aire par lipide de la membrane de deux bactéries	153
Figure S3.4. Suivi de la fréquence de vibration au cours du temps de dépôts de polyélectrolytes successifs	153
Figure 4.1. Hydrogels biocompatibles de ϵ -PLL et de PEGDA aux propriétés antimicrobiennes.....	163
Figure 4.2. Taux de dégradation (A) et de gonflement (B) des hydrogels dans le PBS.....	174
Figure 4.3. CMI de la ϵ -PLL en solution sur <i>S. aureus</i> (A), MRSA (B), <i>E. coli</i> (C) et <i>P. aeruginosa</i> (D)	175
Figure 4.4. Activité antibactérienne directe des hydrogels sur <i>S. aureus</i> (A), MRSA (B), <i>E. coli</i> (C) et <i>P. aeruginosa</i> (D).....	176
Figure 4.5. <i>S. aureus</i> et <i>P. aeruginosa</i> à la surface des hydrogels après 24 h d'incubation...	177
Figure 4.6. Activité antibactérienne des extraits des hydrogels sur <i>S. aureus</i> (A) et <i>P. aeruginosa</i> (B).....	178
Figure 4.7. Activité métabolique des BALB/3T3 après 24 h de traitement avec de la ϵ -PLL en solution	179
Figure 4.8. Activité métabolique des BALB/3T3 après 24 h en contact des hydrogels ϵ -PLL / PEGDA-3.6 et ϵ -PLL / PEGDA-0.7	181
Figure 4.9. CMI de la PAR10 et de la ϵ -PLL en solution sur <i>C. albicans</i>	182
Figure 4.10. Activité antifongique des hydrogels ϵ -PLL / PEGDA-3.6 et ϵ -PLL / PEGDA-0.7 avec ou sans chargement de PAR10 sur <i>C. albicans</i>	183
Figure 4.11. Activité antibactérienne des hydrogels ϵ -PLL / PEGDA-3.6 + PAR10 et ϵ -PLL / PEGDA-0.7 + PAR10 sur <i>S. aureus</i> (A), MRSA (B), <i>E. coli</i> (C) et <i>P. aeruginosa</i> (D)..	184
Figure 4.12. Activité métabolique des BALB/3T3 après 24 h de traitement avec le surnageant des hydrogels extraits	185

Figure 4.13. NO sécrété par les RAW364.7 après 24 h de traitement avec le surnageant des hydrogels extraits	186
Figure 4.14. Nombre de colonies de MRSA par mg de peau de la plaie des souris après 3 jours de traitement avec les hydrogels ϵ -PLL / PEGDA-3.6 et ϵ -PLL / PEGDA-0.7.....	188
Figure 4.15. Quantification des cytokines pro- et antiinflammatoires dans le sang des souris à la fin de l'étude <i>in vivo</i>	190
Figure 4.16. Activité métabolique des cellules BALB/3T3 après 24 h de traitement avec le surnageant des hydrogels ϵ -PLL / PEGDA-3.6 et ϵ -PLL / PEGDA-0.7 extraits dans du milieu de culture	192
Figure 4.17. Evolution temporelle de l'intensité de la fluorescence dans une zone photoblanchie pour l'étude de la mobilité des chaines de ϵ -PLL dans l'hydrogel.....	195
Figure 4.18. Quantité de matières des amines ayant réagi lors de la synthèse de l'hydrogel par mesure de la fluorescence avec la fluorescamine.....	197
Figure 4.19. Protocole mis en place lors de l'étude de la vitesse de migration des cellules épithéliales.....	199
Figure 4.20. Migration des cellules épithéliales dans un gap au cours du temps en présence ou non de ϵ -PLL ou de surnageant des hydrogels extraits.....	200
Figure S4.1. Activité antibactériennes sur <i>S. aureus</i> des hydrogels ϵ -PLL / PEGDA-3.6 et ϵ -PLL / PEGDA-0.7 gélifiés dans des compresses	204
Figure S4.2. Quantification du VEGF dans le sang après les 3 jours de traitement des plaies infectées.....	205
Figure S4.3. Activité métabolique des cellules BALB/3T3 après 24 h de traitement avec différentes concentrations de PEGDA.....	205
Figure 5.1. Principe de fonctionnement de l'activité antibactérienne « contrôlée » des hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal.....	213
Figure 5.2. Déprotection des groupements thiols par réduction des groupements thiopyridones.....	214
Figure 5.3. CMI du polypeptide FITC-PAR10-PC-SH déprotégé par le TCEP sur <i>S. aureus</i> V8.....	215
Figure 5.4. Croissance bactérienne de <i>S. aureus</i> V8 après 24 h de traitement avec différentes concentrations de TCEP.....	216

Figure 5.5. Suivi de la quantité de FITC-PAR10 libérée des hydrogels en présence ou non de GluC par fluorescence.....	219
Figure 5.6. Droite d'étalonnage de la fluorescence en fonction de la concentration de FITC-PAR10-PC-SH.....	220
Figure 5.7. Activité antibactérienne directe des hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal sur <i>S. aureus</i> V8	223
Figure 5.8. Activité antibactérienne sur <i>S. aureus</i> V8 des hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal extraits avec ou sans GluC.....	224
Figure 5.9. Croissance bactérienne de <i>S. aureus</i> V8 après 24 h en contact des hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal chargés avec de la ϵ -PLL en amont de la gélification.....	225
Figure 5.10. Croissance bactérienne de <i>S. aureus</i> V8 après 24 h de culture dans le surnageant des hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal chargés ou non de ϵ -PLL et / ou du polypeptide clivable FITC-PAR10-PC-SH extraits.....	227
Table 1.1. Méthodes utilisées pour déterminer le mécanisme d'action de la ϵ -poly(L-lysine) sur les bactéries et les champignons.....	37
Table S1.1. Tableau récapitulatif des différents biomatériaux composés de ϵ -poly(L-lysine)	60
Tableau 2.1. Structures et masse moléculaires des peptides MAP.....	84
Tableau 2.2. Composés utilisés lors de la synthèse des hydrogels ϵ -PLL / PEGDA.....	85
Tableau 2.3. Composés utilisés lors de la synthèse des hydrogels tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal	85
Tableau 2.4. Tampons utilisés lors de ces travaux de thèse.....	87
Tableau 2.5. Liste des milieux utilisés lors de cette thèse.....	88
Tableau 2.6. Les différentes conditions d'hydrogel ϵ -PLL / PEGDA testées.....	90
Table 3.1. Valeur moyenne de l'aire par lipide.....	134
Table 4.1. Les différentes conditions d'hydrogels de ϵ -PLL/ PEGDA testées.....	172
Table 4.2. Temps de gel et module élastique des hydrogels ϵ -PLL / PEGDA-3.6 et ϵ -PLL / PEGDA-0.7	173

Table 4.3. Scores des grades de sévérité obtenus qualitativement de l'histologie après traitement de la plaie avec ou sans hydrogels.....	189
Tableau 5.1. Concentration finale de FITC-PAR10 / FITC-PAR10-PC-SH libérée des hydrogels après 24 h dans du PBS avec ou sans ajout de GluC.....	221
Tableau 5.2. Hypothèses posées pouvant expliquer l'absence d'activité antibactérienne des hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal sur.....	229

Liste des publications et des communications orales

Publications

- **E. Lebaudy**, S. Fournel, P. Laval, N.E. Vrana, V. Gribova. Recent Advances in Antiinflammatory Material Design. *Adv. Healthcare Mater.*, 10, 2001273 (2021)
- V. Gribova, A. Navalikhina, O. Lysenko, C. Calligaro, **E. Lebaudy**, L. Deiber, B. Senger, P. Laval, N. E. Vrana. Prediction of coating thickness for polyelectrolyte multilayers via machine learning. *Scientific Reports*, 11, 18702 (2021)

Articles soumis ou en cours de soumission

- **E. Lebaudy**, C. Guilbaud-Chéreau, B. Frisch, N.E. Vrana, P. Laval. The high potential of ϵ -poly(L-lysine) for the development of antimicrobial biomaterials. *Soumis au journal Adv. Nano Biomed. Res.* (**Juin 2023**)
- **E. Lebaudy**, F. Barbault, Y. Nominé, B. Senger, J. Rodon Fores, L. Petit, N.E. Vrana, P. Laval, The antibacterial properties of multiple antigenic peptides based on poly(L-arginine): in vitro antibacterial evaluation and molecular dynamic simulations. *Soumission prochaine au journal Small*
- **E. Lebaudy**, S. Hathroubi, B. Frisch, P. Laval, Hydrogels composed of ϵ -poly(L-lysine) and Polyethylene glycol diacrylate with tunable intrinsic antibacterial and antifungal properties. *Soumission prochaine*

Communications orales

- **GDR-B2I**, (*Bio-ingénierie des Interfaces, Toulouse, Septembre 2021*) : ϵ -poly(L-lysine) / poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels with intrinsic antibacterial properties
- **Congrès des doctorants de l'ED182**, (*Strasbourg, Mars 2022*) : "Smart" antibacterial hydrogels for medical applications – *prix du meilleur oral*
- **NanoInBio**, (*Nanosciences for Life and Materials Science, Le Gosier, Mai 2022*) : ϵ -poly(L-lysine) / poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels for wound healing applications
- **GDR MufoPAM** (*Multifonction des Peptides antiMicrobiens, Amboise, Octobre 2022*) : Propriétés antimicrobiennes des "Multiple Antigenic Peptides" à base de poly(L-arginine) : de l'expérimentation *in vivo* à la modélisation moléculaire
- **E-MRS**, (*Material Research Society, Strasbourg, Mai-Juin 2023*) : The antibacterial properties of multiple antigenic peptides: *in vitro* MIC evaluation and molecular dynamic simulations
- **E-MRS**, (*Material Research Society, Strasbourg, Mai-Juin 2023*) : ϵ -poly(L-lysine) / poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels for preventing bacteria and fungi infections
- **Communications orales dans 3 séminaires internes du laboratoire**

Introduction générale

Depuis les dernières décennies, les infections nosocomiales, c'est-à-dire les infections développées dans un milieu hospitalier sont de plus en plus discutées comme un sujet très préoccupant. En effet, le nombre d'infections est en constante augmentation. La moitié de ces infections sont dues à l'utilisation de dispositifs médicaux tels que les cathéters, les implants, les sondes urinaires, etc. ¹. Les infections nosocomiales sont responsables également d'un grand nombre d'échecs lors de la pose d'implants. En effet, les bactéries ont tendance à proliférer au niveau de l'implant après la chirurgie, allant jusqu'à la formation de biofilms ². Ces biofilms permettent notamment à la bactérie de se protéger contre d'autres bactéries et contre des agents antibactériens administrés en tant que traitements antimicrobiens. Les bactéries de ces biofilms sont ainsi bien plus résistantes aux antibiotiques et autres composés antibactériens que les bactéries planctoniques. Ainsi, une fois que la bactérie a formé un biofilm, il devient très compliqué de contrer cette infection et cela entraîne également le rejet de l'implant ³.

Par ailleurs, pour certains profils de patients, l'infection de plaies peut devenir très grave et difficile à soigner. C'est le cas notamment chez les patients diabétiques qui développent des ulcères plantaires, qui sont la cause chaque année de 50 à 80 % des amputations d'un membre inférieur ⁴.

La principale méthode utilisée afin de diminuer le risque d'infection est l'administration d'antibiotiques. Cependant, en raison de l'émergence de souches résistantes face à ces derniers, cette méthode n'est plus suffisante ⁵. L'augmentation du nombre de personnes disposant d'implants, ainsi que l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques, nécessitent de trouver de nouvelles solutions et de nouveaux matériaux possédant des propriétés antimicrobiennes.

Parmi les biomatériaux prometteurs pour traiter les plaies infectées, les hydrogels semblent être une solution prometteuse. En effet, ces matériaux sont constitués d'un réseau 3D capables de retenir une grande quantité d'eau, permettant notamment d'absorber l'excès d'exsudat, mais aussi d'hydrater la plaie, et ainsi d'améliorer la cicatrisation tissulaire ⁶. De nombreuses études sur les hydrogels ont déjà été effectuées et ont permis de disposer d'une large gamme de polymères, synthétiques ou naturels, qui peuvent être utilisés pour le développement d'hydrogels antibactériens et biocompatibles et permettre d'augmenter la vitesse de cicatrisation des plaies ^{7,8}.

C'est dans ce contexte que cette thèse a été effectuée. Cette thèse s'articulera en cinq grandes parties. La première partie présentera l'état de l'art de ces recherches, en se

concentrant notamment sur la recherche sur les peptides antimicrobiens (AMPs) ainsi que sur l'utilisation des hydrogels comme vecteurs de l'activité antimicrobienne. Un exemple concret de l'utilisation d'un biopolymère naturel, la ϵ -poly(L-lysine) (ϵ -PLL), dans le développement de biomatériaux antimicrobiens sera donné. Ensuite, la deuxième partie présentera les matériels et les méthodes qui ont été utilisés tout au long de cette thèse. Une troisième partie sera dédiée à l'étude sur les propriétés antimicrobiennes de peptides d'arginine en fonction de leur structure via des mesures de concentrations minimales inhibitrices et de modélisation moléculaire. La quatrième partie décrira la mise au point et des résultats prometteurs concernant la conception d'hydrogels de poly(éthylène glycol) diacrylate et de ϵ -PLL. Ces derniers montrent en effet des propriétés antibactériennes et antifongiques intrinsèques intéressantes. Une cinquième partie présentera des résultats préliminaires obtenus sur le développement d'hydrogels antimicrobiens « intelligents » répondant à un stimulus biologique. Enfin ce manuscrit terminera par une conclusion générale de ce travail et évoquera les perspectives de cette recherche.

Bibliographie

1. J. P. Guggenbichler, O. Assadian, M. Boeswald and A. Kramer, *GMS Krankenhaushygiene interdisziplinär*, 2011, **6**.
2. M. A. Serbanescu, C. G. Apple and J. S. Fernandez-Moure, *Surgical infections*, 2023, **24**, 258-264.
3. E. C. f. D. P. a. Control, *Healthcare-associated infections: surgical site infections*, ECDC, 2018.
4. A. Hingorani, G. M. LaMuraglia, P. Henke, M. H. Meissner, L. Loretz, K. M. Zinszer, V. R. Driver, R. Frykberg, T. L. Carman, W. Marston, J. L. Mills, Sr. and M. H. Murad, *J. Vasc. Surg.*, 2016, **63**, 3S-21S.
5. T. Verma, A. Aggarwal, S. Singh, S. Sharma and S. J. Sarma, *Journal of Molecular Structure*, 2022, **1248**, 131380.
6. B. Jia, G. Li, E. Cao, J. Luo, X. Zhao and H. Huang, *Mater. Today Bio.*, 2023, **19**, 100582.
7. V. Gribova, F. Boulmedais, A. Dupret-Bories, C. Calligaro, B. Senger, N. E. Vrana and P. Lavalle, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2020, **12**, 19258-19267.
8. W. Cao and C. Gao, *Polymer*, 2020, **186**, 122082.

Chapitre 1. Etat de l'art

Chapitre 1. Etat de l'art

1.1. Introduction générale sur les peptides antimicrobiens	27
1.2. Un peptide antimicrobien naturel : la ϵ -poly(L-lysine) (ϵ -PLL) et son utilisation dans le développement de biomatériaux.....	30
1.2.1. Abstract	30
1.2.2. Introduction	30
1.2.3. Properties of ϵ -PLL	34
1.2.3.1. Antifungal properties.....	34
1.2.3.2. Antibacterial properties	35
1.2.3.3. Elucidation of the antibacterial and antifungal mechanisms	36
1.2.4. Encapsulation of ϵ -PLL.....	39
1.2.4.1. Micro- and nanoparticles	39
1.2.4.2. Nanofibers	41
1.2.4.2. Hydrogels and films	42
1.2.5. Coating surfaces with ϵ -PLL	44
1.2.5.1. Coating of nanoparticles	44
1.2.5.2. Coating of metals.....	48
1.2.5.3. Coating of polymers.....	49
1.2.6. ϵ -PLL for hydrogel synthesis	51
1.2.6.1. Hydrogels based on Schiff base	51
1.2.6.2. Mussel-inspired adhesives and hydrogels	53
1.2.6.3. Carbodiimide chemistry between ϵ -PLL and fatty acids	55
1.2.6.4. ϵ -PLL/chitosan hydrogels.....	56
1.2.6.5. Enzymatically crosslinked ϵ -PLL hydrogels.....	56
1.2.6.6. ϵ -PLL hydrogels based on electrostatic interactions	57
1.2.6.7. Dual network hydrogels containing ϵ -PLL	58
1.2.6.8. Other hydrogel systems.....	59
1.2.7. Conclusion and perspectives	60
Acknowledgments	60
1.2.8. Supporting information	60
1.3. Les hydrogels, biomatériaux prometteurs.....	63
1.3.1. Informations générales sur les hydrogels.....	63

1.3.2. Hydrogels antimicrobiens pour des applications de cicatrisation tissulaire ...	64
1.3.3. Les hydrogels « intelligents »	65
1.4. Conclusion et perspectives	67
Bibliographie	68

1.1. Introduction générale sur les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (AMPs) sont des séquences composées de 12 à 50 acides aminés. Ils sont naturellement présents dans les organismes vivants (bactéries, plantes, animaux et Homme) et sont très étudiés depuis les années 1970. Un grand nombre d'AMPs (autour de 3 000 en 2021) ont déjà été identifiés dans de nombreuses espèces ^{1,2}.

Les AMPs jouent un rôle majeur dans la réponse innée du système immunitaire ^{3,4}. Ils aident en effet à lutter contre les infections et sont connus pour avoir un large spectre d'action, possédant des propriétés antimicrobiennes face à un grand nombre de bactéries, de champignons mais aussi de virus ⁵. Certains participent également à la cicatrisation des tissus lors de lésions. Ils sont peu ou pas cytotoxiques et sont stables dans le temps. Il s'ensuit que les possibilités d'applications sont très nombreuses.

Les AMPs sont majoritairement cationiques (notamment grâce à la présence d'arginines et de lysines) et amphiphiles. Cette caractéristique leur permet d'interagir fortement avec des surfaces chargées négativement, telles que les parois des bactéries, via des interactions électrostatiques ^{6,7}. De nombreuses études du mécanisme d'action de ces peptides sur les bactéries ont été réalisées. Différents mécanismes ont été évoqués mais celui qui a la faveur de la majorité des chercheurs est le suivant. Tout d'abord, le peptide adhère à la surface de la membrane grâce aux interactions électrostatiques entre ses charges positives et les charges négatives de la paroi bactérienne. Le peptide peut ensuite s'adsorber dans la bicouche membranaire, perturber la structure de la membrane et ainsi y former des pores, ce qui peut être létal pour la bactérie. Il peut ensuite rentrer dans la bactérie et perturber le métabolisme bactérien comme inhiber la production d'enzymes ^{8,9}. Le peptide peut également bloquer la réplication et la transcription de l'ADN de la bactérie, mécanismes nécessaires au développement de cette dernière, mais aussi inhiber la synthèse de la membrane bactérienne.

Cependant, tous les AMPs naturels ne peuvent pas être utilisés en tant que molécule thérapeutique. Afin d'améliorer leurs propriétés telles que leur activité antimicrobienne, leur stabilité ou encore leur réactivité, des peptides synthétiques s'inspirant de ces peptides naturels ont été développés au laboratoire ¹⁰⁻¹².

Différentes méthodes peuvent être utilisées afin de modifier un peptide naturel ou bien de synthétiser un nouvel AMP. Par exemple, il est possible de substituer un acide aminé d'un AMP naturel par un acide aminé protéinogène tel que l'arginine ou la lysine pour améliorer les propriétés antimicrobiennes, ou encore de greffer le poly(éthylène glycol) (PEG), un polymère, par « PEGylation » sur le peptide pour améliorer sa solubilité ¹³. Des modifications de peptides pour ajouter de nouvelles propriétés à la molécule sont également possibles. Par exemple,

Torres *et al.* ont étudié un AMP provenant du venin de guêpe ¹⁴. Ce dernier possède des propriétés antimicrobiennes intéressantes mais également une forte toxicité. Grâce à une analyse des différentes fonctionnalités physicochimiques que possède la molécule, ils ont pu concevoir un nouvel AMP qui possède les mêmes propriétés antimicrobiennes que celui du venin de guêpe mais présente une toxicité drastiquement plus faible. De plus, ils ont observé que ce nouveau peptide synthétique agissait sur les cellules cancéreuses et permettait de réduire leur prolifération.

Les AMPs sont donc beaucoup étudiés pour leur activité antimicrobienne et pourraient être utilisés comme alternative aux antibiotiques. En effet, les bactéries génèrent de plus en plus de mécanismes de résistance face aux antibiotiques, rendant ces derniers de moins en moins efficaces dans le traitement des infections. Avec l'augmentation du nombre d'infections nosocomiales (qui représentent 50 % des infections en milieu hospitalier), notamment dues aux dispositifs médicaux, il est urgent de trouver de nouvelles stratégies pour diminuer le risque de contracter l'une de ces infections.

Des études ont montré que les bactéries infectieuses acquièrent moins de résistance aux AMPs en comparaison avec les antibiotiques ^{6, 15}. Différents mécanismes de résistance des microorganismes face aux antibiotiques ont été identifiés. Par exemple, les microorganismes peuvent développer des enzymes capables de modifier directement l'antibiotique, ils peuvent aussi altérer la manière dont l'antibiotique entre ou sort de la membrane par efflux, ou encore complètement modifier la structure des protéines ciblées par l'antibiotique ¹³. Au cours de la genèse de cette résistance, une dose plus importante d'antibiotiques devient nécessaire pour traiter les différentes générations de bactéries jusqu'à ce qu'une génération de bactérie ne soit plus du tout sensible à ce même antibiotique quelle que soit sa concentration. L'utilisation d'AMPs à la place d'un antibiotique semble donc intéressante pour contrer l'augmentation du nombre de bactéries résistantes. Par exemple, Jangir *et al.* montrent que l'utilisation des AMPs limite l'acquisition de résistance des bactéries grâce notamment au fait que les mécanismes d'action des peptides sur les bactéries sont pluriels tel qu'évoqués plus haut ¹⁶.

Cependant, malgré ces résultats prometteurs, une résistance aux AMPs par les bactéries est tout de même présente sur le long terme. Ainsi, la solution envisagée par de nombreux chercheurs afin de prévenir l'antibiorésistance est de combiner les AMPs et les antibiotiques dans le traitement de l'infection ^{17, 18}. En effet, des effets synergiques sont observés entre un grand nombre d'AMPs et d'antibiotiques. La combinaison de ces deux molécules permettrait ainsi d'augmenter l'action antimicrobienne des deux molécules contre les pathogènes tout en diminuant le risque de développement d'antibiorésistance, puisque les doses nécessaires pour combattre l'infection de chaque molécule seront plus faibles. De même, envisager l'utilisation

de peptides inhibant la bactérie par des modes d'action différents les uns des autres (par exemple certains qui agissent sur la transcription de protéines par la bactérie et d'autres sur la synthèse de l'acide nucléique), permettrait de diminuer le développement de souches résistantes.

Malheureusement, il n'est pas toujours aisé d'utiliser ces molécules à des fins thérapeutiques car leur délivrance peut être difficile en fonction du milieu où elles devraient agir (milieu acide, infection très localisée, etc.). Des stratégies pour délivrer ces peptides au niveau d'un site infectieux et sur des temps plus longs doivent être développées. En raison du risque croissant d'infections nosocomiales, il est urgent de concevoir de nouveaux matériaux antimicrobiens d'autant plus qu'une grande partie des infections nosocomiales est due aux dispositifs médicaux tels que les implants (en titane ou en céramique par exemple) et les cathéters.

Parmi les solutions, un grand nombre de chercheurs essaient d'immobiliser les AMPs sur la surface de matériaux, que ce soit des métaux ou des matériaux polymériques^{19, 20}. Cette approche peut avoir comme avantage de prévenir la formation d'un biofilm bactérien sur le matériau, mais surtout de concentrer les peptides actifs dans la région d'intérêt²¹. Ainsi la dose requise pour combattre l'infection serait plus faible que lors d'une administration systémique qui, inévitablement, souffre d'un effet de dilution du principe actif.

Une deuxième stratégie est également largement mentionnée dans la littérature. Il s'agit du chargement d'AMPs dans des hydrogels. Les hydrogels sont en effet des matériaux très prometteurs pour des applications médicales, notamment pour la cicatrisation des plaies et pour la prévention des infections. Le chargement d'AMPs dans un hydrogel permet leur libération locale et contrôlée pour préserver l'activité antimicrobienne sur une période choisie^{22, 23}. Les potentialités thérapeutiques des hydrogels antimicrobiens seront présentées plus en détails dans la partie 1.3. de cette partie introductive.

Parmi les AMPs, les homopolymères (ou homo polypeptide), c'est-à-dire des polymères (ou peptides) qui sont constitués d'un seul type de monomère, et de faible poids moléculaire pour les polypeptides, sont largement étudiés pour leurs propriétés antimicrobiennes. Parmi ces derniers, la ϵ -poly(L-lysine) (ϵ -PLL) a présenté des résultats prometteurs lors de son utilisation au sein d'un biomatériau, notamment grâce à sa toxicité très faible comparée à celle de la α -poly(L-lysine). Un état de l'art des recherches qui ont été effectuées sur ce peptide est présenté dans la partie 1.2. puis la description de son utilisation dans les hydrogels est présenté dans la partie 1.3.

1.2. Un peptide antimicrobien naturel : la ϵ -poly(L-lysine) (ϵ -PLL) et son utilisation dans le développement de biomatériaux

Rédigé sous forme d'article de revue soumis au journal Adv. Nano Biomed. Res.

The high potential of ϵ -poly(L-lysine) for the development of antimicrobial biomaterials

Eloïse Lebaudy, Chloé Guilbaud-Chéreau, Benoit Frisch, Nihal Engin Vrana, Philippe Laval

1.2.1. Abstract

ϵ -(poly-L-lysine) (ϵ -PLL) is a natural polypeptide/polycation originating from bacteria. Thanks to its antifungal and antibacterial properties, it is the subject of extensive research in the food and medical industries. ϵ -PLL is also used to develop biomaterials in a broad range of applications, such as drug delivery, wound healing, or antimicrobial coatings. Indeed, loading ϵ -PLL inside nanoparticles, functionalizing implant surfaces with ϵ -PLL, or developing hydrogels based on reactions between ϵ -PLL and other polymers can improve the materials properties, leading to biocompatible, antibacterial, and antifungal systems. These characteristics are necessary for the development of biomaterials, for their integrity in a biological environment, but also for improving the performances of medical devices. Moreover, ϵ -PLL can be used as an alternative to antibiotics as its mechanism of action reduces the bacterial resistance risk compared with antibiotics. Finally, "smart" systems using ϵ -PLL may be developed, with controllable material degradation or drug delivery via pH or temperature variations. This review sought to gather the latest research on the development of antimicrobial biomaterials based on the ϵ -PLL polypeptide.

1.2.2. Introduction

Nowadays, antibiotics are the principal means of treating infections. However, bacteria develop resistance to these molecules and inhibit their bactericidal actions.²⁴ New solutions are required to treat infections and prevent the emergence of bacterial resistance. In fact, infections caused by antibiotic-resistant bacteria are currently responsible for over a million deaths a year worldwide.²⁵ Antimicrobial peptides (AMPs) are an interesting alternative to antibiotics. Although their mechanisms of action on bacteria are not yet well understood, researchers tend to describe these molecules' effects on cells as follows. First, the peptides adhere to the bacteria surface via electrostatic interactions between positive charges of AMPs and negative charges located on the bacteria membrane.²⁶ Then, their adsorption to the membrane is

followed by the disruption of the membrane structure until pores are formed in the bacterial membrane.^{16, 18} Finally, researchers suggest that AMPs can modify the bacterial metabolism. So far, the bacteria are unable to develop resistance to these molecules. The use of AMPs and its derivatives, such as ϵ -poly-L-lysine (ϵ -PLL), as antimicrobial agents is therefore promising to solve the antibiotic resistance issue.

Poly-L-lysine is a cationic, water-soluble polymer widely used in the development of biomaterials. As the amino acid lysine has two amine groups, different poly-L-lysines can be obtained depending on which amine function reacts with the carboxyl function to form the peptide bond. The amine groups are located on the alpha and epsilon carbons, which enables the synthesis of α -poly-L-lysine (α -PLL) and ϵ -PLL.

α -PLL is a synthetic polymer synthesized by polycondensation and is widely used for coating tissue culture material to improve cell adhesion. This biopolymer is both biocompatible and biodegradable. Besides, the α -L-lysine amino acid seems to be vital for eukaryotic and prokaryotic cells.²⁷

Unlike α -PLL, ϵ -PLL, which has been studied since the end of the twentieth century, is produced naturally by *Streptomyces albulus* bacteria and some *Bacillus* (**Figure 1.1**).²⁸⁻³⁰ It consists of 25–30 L-lysine residues linked together by peptide bonds between the carboxyl and ϵ -amino groups of L-lysine. ϵ -PLL is positively charged at physiological pH, with an isoelectric point around 9 for 25–30 L-lysine residues.²⁹ It is widely investigated in the food industry for its strong antifungal and antibacterial properties against gram-positive and gram-negative bacteria.³⁰⁻³² Moreover, due to its synthesis mechanism, ϵ -PLL has a very low cytotoxicity.³³ Finally, ϵ -PLL is easily degraded into biocompatible products by natural enzymes produced by different bacteria, but also by various proteases.^{29, 34} Nowadays, it is used as a food preservative and is recognized as a safe antimicrobial agent by the US Food and Drug Administration. It is now being used in the food industry in many countries, such as the United States and Japan. Although the difficulty to polymerize ϵ -PLL by a chemical way, it is still possible to modify the activator in the synthesis of α -PLL to obtain ϵ -PLL.³⁵ Ho *et al.* showed that it is then possible to selectively synthesize ϵ -PLL by polycondensation of L-lysine using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide as activating agent.³⁶ The polypeptide's antibacterial and antifungal properties were shown to vary according to its structure and chain size.³⁷ For instance, chains with less than nine L-arginine residues have no antibacterial properties. Moreover, synthetic α -PLL based on the reaction between carboxyl groups and α -amino groups exhibits longer structures than ϵ -PLL synthesized by bacteria. In addition, the antibacterial properties of α -PLL are weaker than those of ϵ -PLL.³⁸ ϵ -PLL can also be combined

with antifungal or antibacterial drugs (such as vancomycin and itraconazole) to achieve a synergistic effect, thereby enhancing the properties of both the polypeptide and the drugs.³⁹

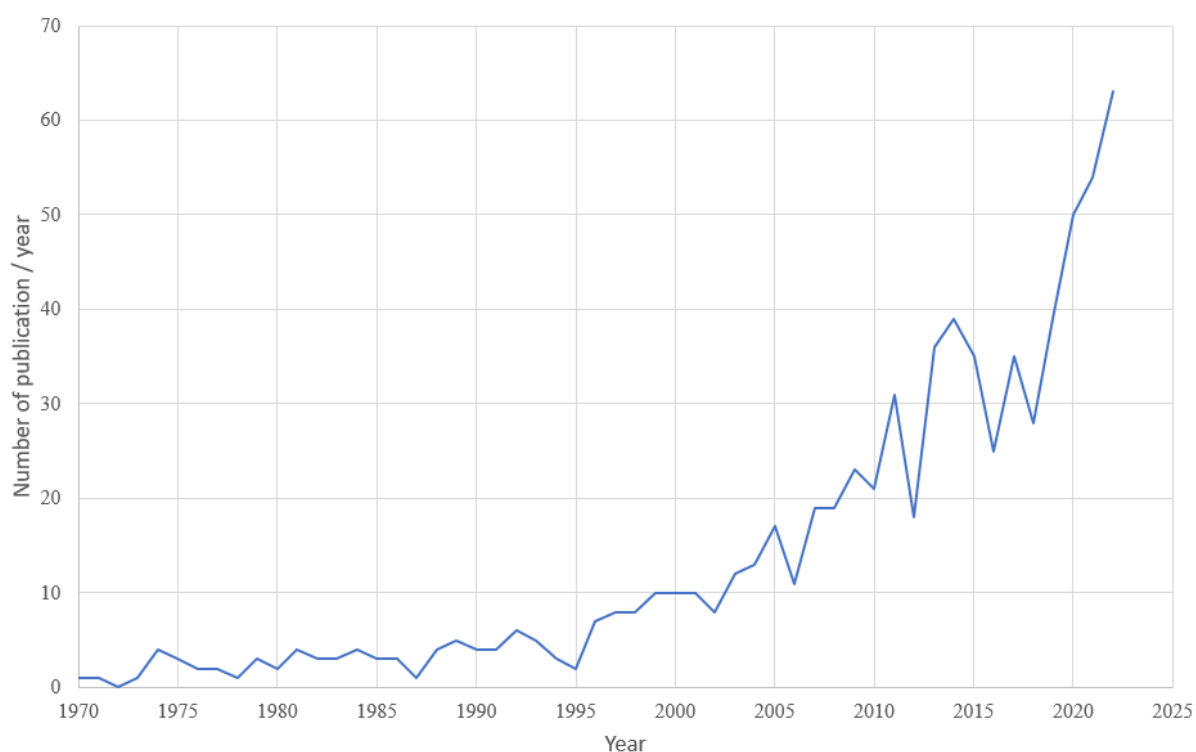


Figure 1.1. Number of publications containing "poly-epsilon-lysine" between 1970 and 2022 (Source: Web of Science).

ϵ -PLL also possesses interesting properties such as biodegradability and water-solubility, which may be of interest for a number of different applications.⁴⁰ All these features in addition to the biocompatibility of ϵ -PLL are very useful for the synthesis of various ϵ -PLL-based structures.³⁵ The properties of ϵ -PLL can be improved by forming complexes or encapsulating the polypeptide in microcapsules, for example.⁴¹ Given its appealing characteristics, a growing number of researchers have turned their attention to ϵ -PLL for the development of biomaterials with medical applications (**Figure 1.2**). Various strategies have been proposed to build up materials based on different chemical or physical reactions, like carbodiimide chemistry, enzymatic cross-linking, and electrostatic interactions between polymers.⁴²⁻⁴⁴ ϵ -PLL can be easily loaded inside micro- or nanoscaffolds and released to deploy antibacterial and antifungal properties. Numerous studies have been performed on the encapsulation of ϵ -PLL in nanoparticles, films, or hydrogels for the development of drug delivery systems, with potential control of ϵ -PLL release.⁴⁵⁻⁴⁷ Moreover, due to its amine functions, ϵ -PLL can react with material surfaces that have been previously functionalized (with N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride [EDC] and sulfo-N-hydroxysuccinimide [sulfo-NHS] for instance) to form a coating that reduces cytotoxicity of certain materials and improves their

antibacterial properties.⁴⁸ Various surfaces can be coated, such as metals or polymers.⁴⁹ ϵ -PLL can also be grafted onto nanoparticle and micro scaffold surfaces, such as cellulose beads, for example.^{50, 51} ϵ -PLL may also react with other polymers to produce three-dimensional (3D) networks, such as hydrogels.⁵²

All these biomaterials can be used in various applications, such as wound healing and tissue engineering, drug and gene delivery systems, or biological adhesives.⁵³ The large spectrum of applications has demonstrated the power of using ϵ -PLL in biomaterials and its interest for solving issues in the medical field. Thus, this review aimed to gather the latest studies on ϵ -PLL-based biomaterials for medical applications and to show the wide range of potential applications of ϵ -PLL in the field of biomaterials. An overview table can be found in the supporting data (**Table S1.1**).

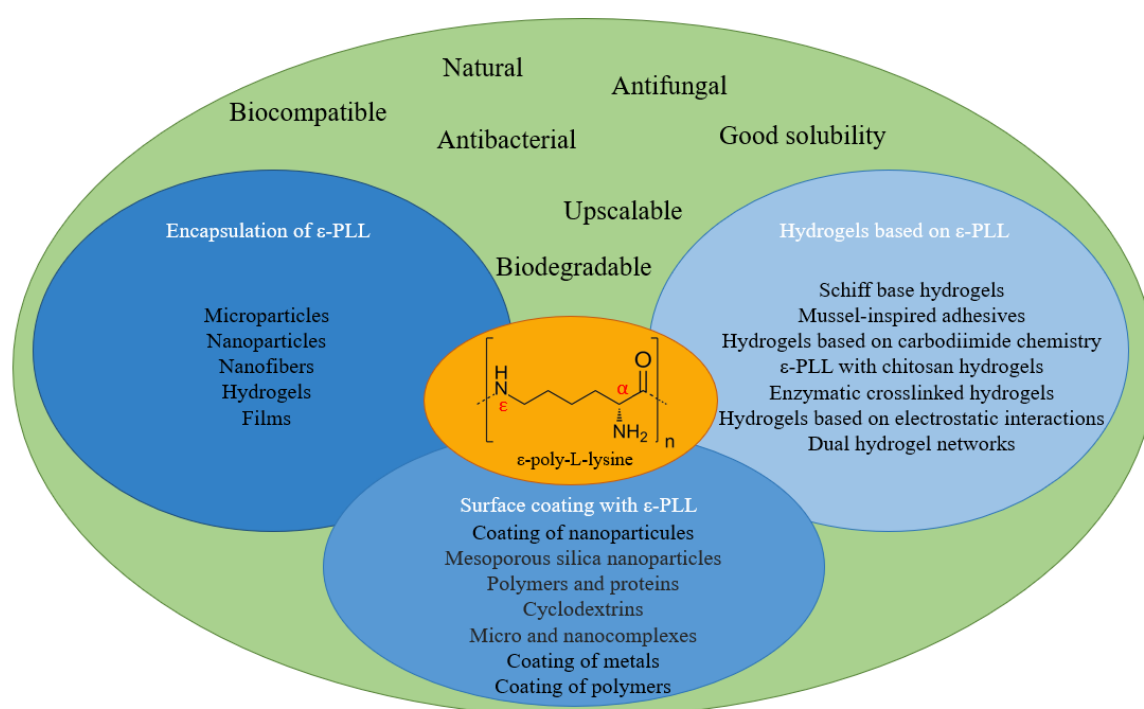


Figure 1.2. Overview of the different properties of ϵ -poly-L-lysine and its main uses in biomaterial development. ϵ -poly-L-lysine is highly used for the development of material for medical applications, mostly due to its antibacterial and antifungal properties. Various strategies are studied such as the encapsulation of ϵ -poly-L-lysine, surface coating or hydrogels synthesis.

1.2.3. Properties of ϵ -PLL

1.2.3.1. Antifungal properties

ϵ -PLL is widely used in the food industry as a preservative due to its antifungal properties against various fungi and its non-toxic nature.^{54, 55} Some studies have been carried out to better understand the mechanism of action of ϵ -PLL on fungi, which has yet to be clarified.³² Numerous fungi responsible for food contamination have been investigated, such as *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata*, but very little research has been undertaken to explore the mechanism of action of ϵ -PLL on fungi found in hospital-associated infections (HAIs). Among the fungi associated with HAIs, *C. albicans* is the most extensively studied, as it is commonly involved in nosocomial diseases.^{56, 57} In recent decades, there has been an increase in mortality from *C. albicans* fungal infections, with approximately 25,000 cases of candidiasis per year in the United States, according to the Centers for Disease Control and Prevention.⁵⁸ It is therefore crucial to understand the mechanism underlying the antifungal activity.⁵⁹ Some researchers have looked into this issue and proposed a method to better understand the mechanism involved. For example, Padilla-Garfias *et al.* studied the mechanism of action of ϵ -PLL on *C. albicans* and *S. cerevisiae*.⁶⁰ They showed that ϵ -PLL altered the fungal membrane through electrostatic interactions between positive charges of the polypeptide and the negatively-charged fungal membrane. Membrane permeability was shown to decrease with increasing ϵ -PLL concentration, leading to a leakage of cations from the cytoplasm (Ca^{2+} and K^+). Moreover, they noted an increase in the pH of the cultured medium with the addition of ϵ -PLL, whereas it normally decreases in the presence of *C. albicans*. Finally, these pH changes damage metabolic mechanisms of yeasts, such as fermentation and cellular respiration, and lead to fungal lysis (**Figure 1.3**).³² Another study by Wei *et al.* also presented results on the mechanism of action of ϵ -PLL on fungi.⁶¹ They demonstrated that the peptide damages the fungus morphology and its cell wall, thereby inducing a loss of cytoplasm. These results were confirmed by Jiao *et al.* in 2020.⁵⁴

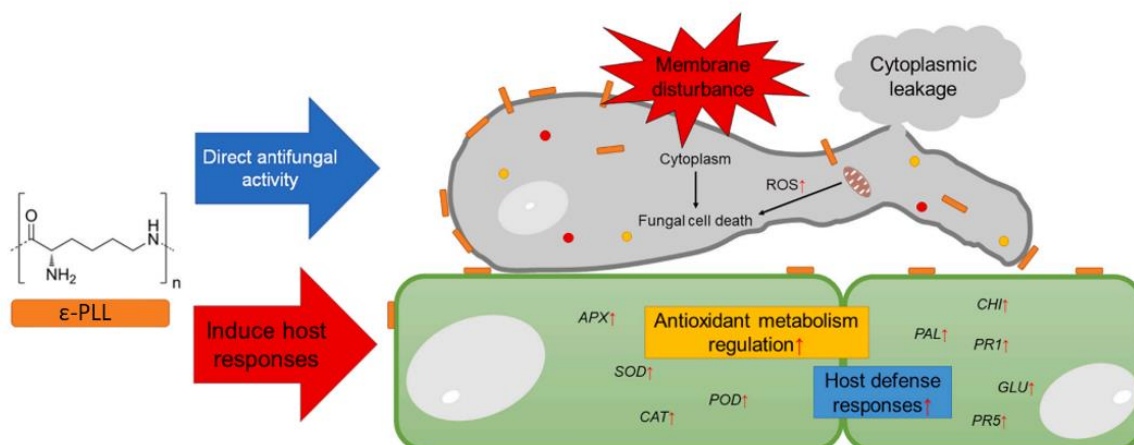


Figure 1.3. Mechanism of action of ϵ -PLL on fungi. ϵ -PLL creates pores and reduced cell membrane permeability leads to cytoplasm efflux. Adapted with permission.³² Copyright 2021, Elsevier.

1.2.3.2. Antibacterial properties

ϵ -PLL has also been extensively researched for its antibacterial properties against a broad range of gram-positive and gram-negative bacteria. Hyldgaard *et al.* proposed a mechanism to explain the bactericidal effects of ϵ -PLL on *E. coli* gram-negative bacteria (Figure 1.4).⁶² They showed that initially, ϵ -PLL disrupts the bacterial membrane via electrostatic interactions with negatively-charged phospholipids. Then, following this carpet-like mechanism, the lipopolysaccharide layer is removed by ϵ -PLL, which induces negative membrane curvature and leads to the formation of micelles and pores in the bacterial membrane. The resulting permeability of the outer membrane leads to bacterial lysis. Peptide permeation of bacterial membranes has been validated by almost all researchers.⁶³ Studies on the *S. aureus* gram-positive bacteria were also carried out.⁶⁴ The proposed mechanism is quite similar to the previous one, with a change in the structure of cell membrane peptidoglycans when the bacteria are treated with ϵ -PLL. The permeability of the membrane was also increased. Eventually, it has been suggested that ϵ -PLL penetrates the bacteria and inhibits their metabolic activity as cellular glucose and citrate concentrations increase. Hence, the bacteria are no longer able to metabolize glucose, and the tricarboxylic acid cycle is suppressed by ϵ -PLL, leading to the inhibition of metabolic pathways.

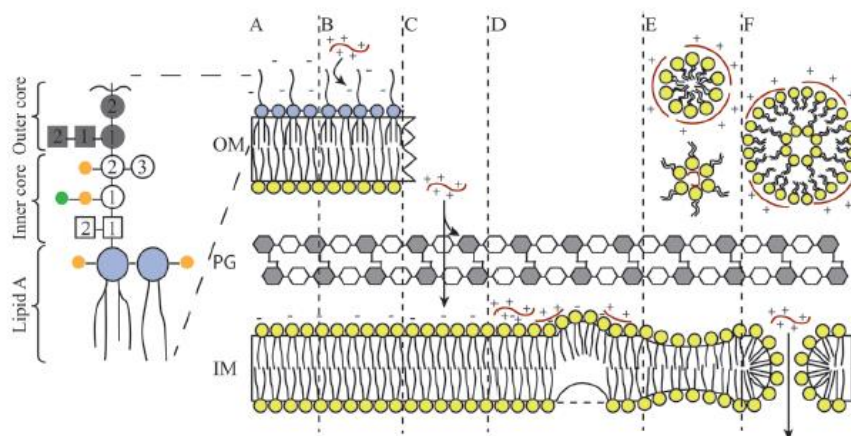


Figure 1.4. Mechanism of action of ϵ -PLL on *E. coli* cell membrane⁶². ϵ -PLL is represented in red, while phospholipids are displayed in yellow. The bacteria's outer membrane (OM), peptidoglycan layer (PG), and inner membrane (IM) of normal *E. coli* cells are first presented (A). Then, when ϵ -PLL comes in contact with the bacteria, it interacts with lipopolysaccharides (purple headgroup) of the OM via electrostatic interactions, thus removing the lipopolysaccharide layer (B). Next, ϵ -PLL comes in contact with peptidoglycans between the OM and IM, but it is unknown whether it interacts with them or merely crosses the peptidoglycan barrier (C). The interaction of ϵ -PLL with the IM results in a negative curvature of one membrane leaflet (D). The IM becomes thinner due to this curvature and phospholipids are removed and rearranged into micelles (E). Finally, when both leaflets have been removed by ϵ -PLL, a hole appears in the membrane. ϵ -PLL can penetrate the cell and damage its interior (F). Reproduced with permission.⁶² Copyright 2014, American Society for Microbiology Journal.

The structure of ϵ -PLL can also impact its antibacterial properties. Depending on pH, the number of positive charges on ϵ -PLL molecules, and therefore the electrostatic interactions with the bacterial outer membrane, undergoes changes.⁶⁵

1.2.3.3. Elucidation of the antibacterial and antifungal mechanisms

Various methods can be employed to elucidate the mechanism of action of ϵ -PLL on fungi and bacteria (**Table 1.1**). Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) are interesting techniques for imaging the structure and morphology of fungi incubated with ϵ -PLL and for checking whether the peptide disrupts the cell membrane (**Figure 1.5**).⁶⁶ Fungal membranes treated with the highest concentration of ϵ -PLL exhibited pores. The permeation can subsequently be quantified by bacterial or fungal staining with propidium iodide, followed by confocal microscopy fluorescence imaging.⁶⁴ Researchers observed high amounts of propidium iodide entering the cells, indicating high membrane permeability when ϵ -PLL was applied.

Moreover, cytoplasmic leakage of fungi can be characterized by absorbance, as previously described by quantifying Ca^{2+} and K^{+} cations in the supernatant in which fungi were incubated.⁶⁰ This method indicates that ϵ -PLL induces cell membrane permeation, but also changes *S. aureus* membrane peptidoglycan morphology.

Other properties can be characterized to show the impact of the polycation on fungal membranes. For example, ϵ -PLL-induced reactive oxygen species (ROS) can be quantified using a fluorimetric assay. Confocal microscopy has also been used for quantifying the oxidative stress induced by the polycation on fungi. ROS were found to be increased due to the presence of ϵ -PLL, leading to a decrease in fungal viability. Besides, Padilla-Garfias *et al.* have shown that ϵ -PLL inhibits two necessary metabolic processes for fungi: fermentation and cellular respiration.⁶⁰

Adenosine triphosphate (ATP) levels can then be determined with the BacTiter-Glo kit using fluorescence quantification.⁶⁴ It is likely that ϵ -PLL decreases ATP levels, but also inhibits the tricarboxylic acid cycle and glycolysis.

Finally, the metabolic and enzymatic activities of bacteria and fungi can be monitored to determine the impact of ϵ -PLL on the cells.

Table 1.1. *Methods used for determining the mechanism of action of ϵ -PLL on both bacteria and fungi.*

Studied parameters	Technique used	Effect of ϵ -PLL	References
Cell morphology	SEM	Induces pores on the outer cell membrane	32, 61, 64, 67
	TEM		60, 68
Ultrastructural change in membrane	TEM	Induces cell membrane concavity and disruption	32, 61, 69
Membrane permeability	Propidium iodide	Increases fluorescence leakage	64
	Efflux of K ⁺ and Ca ²⁺ cations by ICM-MS and flame photometer	Increases K ⁺ and Ca ²⁺ efflux from the cell's inside	60
	Flow cytometry	Induces plasma membrane disruption	67
	β -galactosidase activity	Inhibits β -galactosidase activity	68
Cytoplasmic content leakage (protein, phosphate)	Bradford assay	Increases protein, inorganic phosphate, and cytoplasmic leakage	32, 61, 67
	Inorganic phosphate quantification by Fiske and Subbarow method		60
	BCA protein assay kit		68
ATP level	BacTiter-Glo kit	Decreases the ATP level and inhibits the tricarboxylic acid cycle and glycolysis	64
	CleanSense Surface Hygiene Test kit		68
Oxidative stress	ROS quantification (by confocal microscopy)	Induces oxidative stress via an increased ROS formation	32, 60
	Malondialdehyde quantification with thiobarbituric acid	Increases the malondialdehyde content	32, 61, 67

ATP: Adenosine triphosphate, BCA: Bicinchoninic acid, ICM-MS: Inductively coupled plasma mass spectrometry, ROS: Reactive oxygen species, SEM: Scanning electron microscopy, TEM: transmission electron microscopy

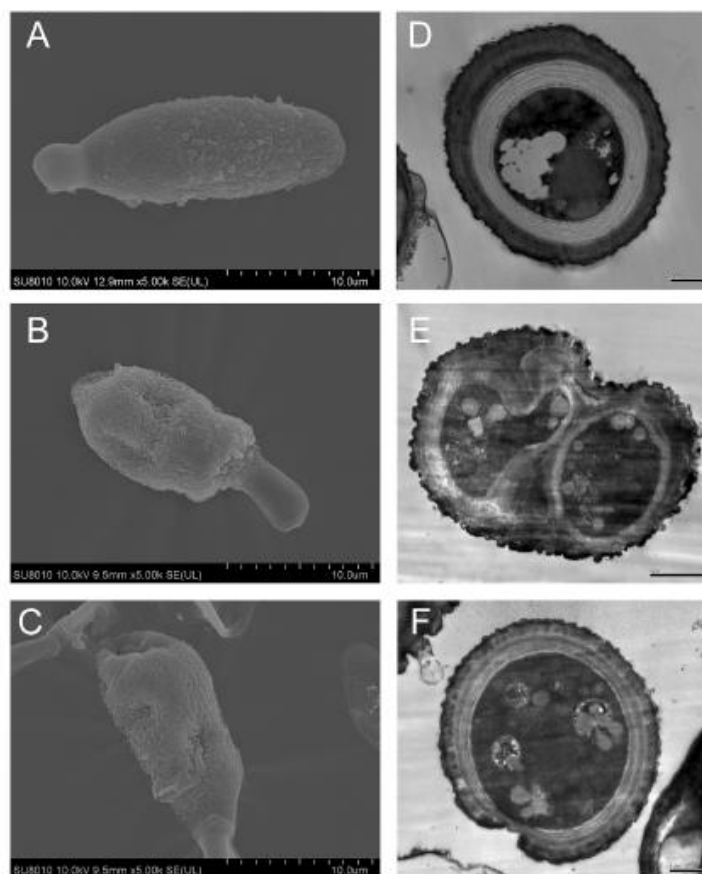


Figure 1.5. Scanning electron microscopy (A–C) and transmission electron microscopy (D–F) images of the morphology and microstructure of *A. alternate* treated with 0 (A and D), 200 (B and E), and 500 mg.mL⁻¹ (C and F) of ϵ -PLL. Reproduced with permission.³² Copyright 2021, Publisher.

1.2.4. Encapsulation of ϵ -PLL

To enhance its antibacterial or therapeutic properties upon release, ϵ -PLL can be encapsulated within materials, such as micro- and nanoparticles, nanofibers, hydrogels, or films.

1.2.4.1. Micro- and nanoparticles

Micro- and nanoparticles are extensively investigated for treating various medical conditions. Drugs can be loaded inside them as part of a drug delivery system and their release can be controlled externally.^{70, 71} Moreover, drugs loaded inside nanoparticles often exhibit an enhanced activity compared to drugs in solution, which is attributed to the higher local drug concentration within the nanoparticles. Thus, lower drug doses can be administered for therapy when nanoparticles are used. Besides, nanoparticles protect drugs from “harsh” environment, such as the gastric milieu for instance.⁷²

Like other drugs, ϵ -PLL can be encapsulated in nanoparticles and then released to act as antibacterial agents. Li *et. al* developed nanocapsules based on chitosan combined with

sodium alginate via polyelectrolyte complexation reaction in order to encapsulate ϵ -PLL and epigallocatechin gallate, another natural antibacterial agent.⁷³ They achieved a 78.2% encapsulation efficiency, which provides a good antibacterial activity and ϵ -PLL stability.

Chitosan can also be used in combination with bovine serum albumin to develop biodegradable nanodelivery systems through ionotropic complexation between the two polymers in presence of salts to treat gastroesophageal diseases.⁴⁶ ϵ -PLL can be loaded inside these polysaccharide-based nanosystems, prior to the gelation process, to be released from the system slowly over time. This carrier improves the stability of ϵ -PLL. Moreover, the highly acidic pH of the esophageal environment adversely affects the antibacterial properties of ϵ -PLL. Thus, incorporating this polymer inside this scaffold was shown to improve its antibacterial activity against *H. pylori* in acidic pH conditions.⁴⁶ Hence, the encapsulation of ϵ -PLL in nanodelivery systems holds great promise for the treatment of several diseases.

Chevalier *et. al* described a method to encapsulate ϵ -PLL inside polylactic acid/poly-D,L-lactide-co-poly(ethylene glycol)-based microparticles using electrohydrodynamic technology, which is based on electrically charged fluids.⁴⁵ These microparticles can be used as drug carriers for release of ϵ -PLL in cancer therapy, as L-lysine inhibits pancreatic tumor cell proliferation.

Micro- and nanocomposite hydrogels based on carbonated hydroxyapatite and agarose can incorporate ϵ -PLL to develop membranes with an antibacterial activity achieved through the release of ϵ -PLL over time.¹ To this end, agarose was first dissolved with ϵ -PLL. Subsequently, carbonated hydroxyapatite was added to strengthen the mechanical and osteoconductive properties and mixed altogether with agarose and ϵ -PLL. Finally, the mixture of agarose, ϵ -PLL, and carbonated hydroxyapatite solidified to form the membrane. The resulting membrane exhibits favorable characteristics suitable for tissue engineering applications. Indeed, the membrane promotes osteogenic differentiation and cell adhesion, while also demonstrating antibacterial properties against *S. aureus* and *E. coli* due to the release of ϵ -PLL. The release rate can be adjusted by modifying the concentration of carbonated hydroxyapatite.

ϵ -PLL can be used for biosensor applications as well. Microparticles of ϵ -PLL and heparin have indeed been studied in order to detect triglycerides in atherosclerosis, heart diseases, and hypertension.⁷⁴ These microparticles were formed through electrostatic self-assembly of ϵ -PLL and heparin. They were then deposited onto a glassy carbon electrode, followed by the addition of lipase and dopamine on its surface. Self-polymerization of dopamine allowed the microparticles and lipase to be strongly attached to the electrode. The final system produced interesting results for a use as a biosensor in the diagnosis of clinical conditions.

Loading ϵ -PLL inside nano- and micro-scaffolds can improve its antibacterial and therapeutic properties, as well as its stability and its bioaccessibility.

1.2.4.2. Nanofibers

Among nanocarriers, polymer-based nanofibers have been widely studied as wound dressing materials.^{75, 76} Nanofibers were mostly produced using the electrospinning technique. The fibers can be functionalized with ϵ -PLL via electrostatic adsorption on the dressing using a buffer solution containing the peptide.⁷⁷ Nanofibers composed of polyvinyl alcohol (PVA) and polyacrylic acid (PAA) and functionalized with ϵ -PLL were prepared using this technique.⁷⁷ They displayed an antibacterial activity over 14 days and a good biocompatibility with human corneal epithelial cells (HCepCs), while also exhibiting an antitumor activity against HeLa cells due to the addition of ϵ -PLL.

PVA can also be used with poly- ϵ -caprolactone (PCL) to form nanofibers.⁷⁸ Lan *et al.* developed a core-shell structure of nanofibers. To form the shell suspension, ϵ -PLL was dispersed in chloroform/dimethylformamide, with subsequent addition of PCL. To form the core solution, tea polyphenols displaying antioxidant properties were mixed with PVA. Finally, the two solutions were added to a coaxial spinneret to form the nanofibers. ϵ -PLL can be released at a high rate from the nanofibers, thereby preventing infections, and tea polyphenols are protected inside the core of the structure, which improves the biocompatibility of the materials. The incorporation of ϵ -PLL and tea polyphenols can facilitate wound healing, with an increased antioxidant activity and strong antibacterial properties against *E. coli* and *S. aureus* bacteria.

Gelatin is a protein that can be used for nanofiber dressing formation.⁷⁹ ϵ -PLL was added to the system with polydopamine to crosslink the gelatin nanofibers. Nanofibers can then be collected on different materials, such as bandage gauze. The dressings have shown wound healing properties on burned wounds, along with antibacterial properties, and can thus promote cell regeneration of the skin.

Finally, ϵ -PLL may replace other antimicrobials in dressings. For instance, Yang *et al.* proposed to replace silver by starch nanofiber mats with ϵ -PLL to prevent the potential risks of metals *in vivo*.⁸⁰ ϵ -PLL was attached to the starch nanofibers via a crosslinking method, and the properties of this material were compared to a commercial silver-containing dressing. The ϵ -PLL-containing nanofibers exhibited antibacterial properties against gram-positive and gram-negative bacteria over 14 days, which were accounted for by the release of ϵ -PLL during starch degradation. The nanofibers were less cytotoxic than the commercial dressing. These materials have thus the potential to improve traditional dressings.

1.2.4.2. Hydrogels and films

1.2.4.2.1. ϵ -PLL loaded inside hydrogels

Hydrogels are 3D scaffolds that retain a high amount of water and can be prepared with natural polymers.⁸¹ The properties of hydrogels have been studied for a variety of applications, such as wound healing, tissue engineering, and drug delivery.⁸² Besides, their 3D structure can easily be used to load drugs and polypeptides. ϵ -PLL can be loaded inside chitosan hydrogels. A gelling agent, such as β -glycerophosphate, was studied to prepare a chitosan-based hydrogel.⁸³ ϵ -PLL at low concentrations was added to the reactive mixture before gelation. Hydrogels also show a good stability over time in phosphate-buffered saline (PBS), with a weight loss of approximately 33% after 72 hours. In addition, loading ϵ -PLL in hydrogels was associated with decreased biofilm thickness in a porcine model of skin wound biofilm.

Cheng *et al.* developed hydrogels capable of releasing ϵ -PLL during their degradation.⁸⁴ They chemically attached ϵ -PLL-grafted graphene quantum dots inside hydrogels based on quaternized chitosan and benzaldehyde-terminated 4-armed polyethylene glycol (PEG). Imine bonds were formed between the aldehyde functions of benzaldehyde-terminated 4-armed PEG and the amine of chitosan to crosslink the hydrogel. These bonds were easily broken when the environmental pH decreased due to the presence of bacteria, which elicited hydrogel degradation and the release of ϵ -PLL graphene quantum dots. The releasing of these molecules induced bacterial lysis (**Figure 1.6**). In addition, ϵ -PLL graphene quantum dots can react with xenon light to deliver antibacterial photo-thermal therapy against infections, and more specifically against diabetic ulcers, as presented by Cheng *et al.* in their study on infected wounds of diabetic rats. Finally, these hydrogels showed self-healing properties and good biocompatibility, and could promote wound healing.

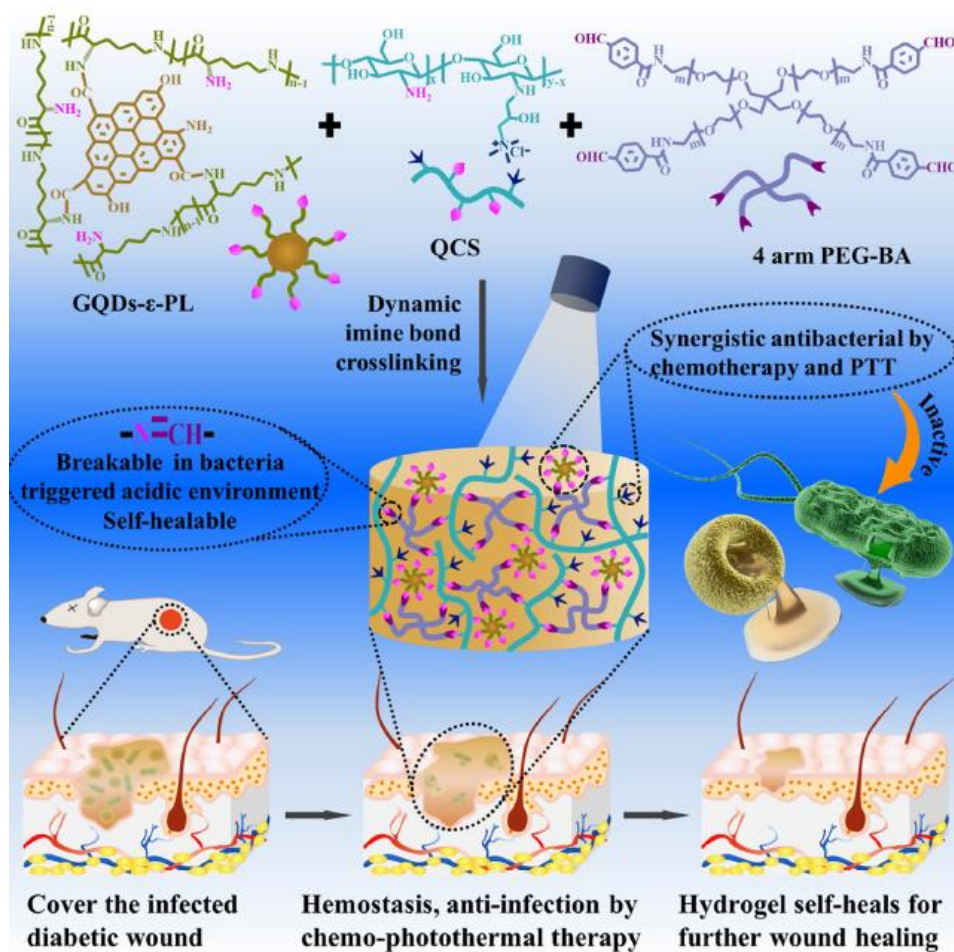


Figure 1.6. Schematic structure of hydrogels based on ϵ -PLL-grafted quantum dots, quaternized chitosan, and benzaldehyde-terminated 4-armed PEG. The hydrogels presented breakable bonds at low pH, self-healing properties, and antibacterial properties, and were also studied for chemotherapy applications. Reproduced with permission.⁸⁴ Copyright 2022, Elsevier.

1.2.4.2.2. ϵ -PLL loaded inside films

ϵ -PLL can be loaded inside hydrogels, but also in films. ϵ -PLL release from a composite film can be controlled by modifying the crosslinker for instance. Mousavi *et al.* studied the effect of the crosslinker type on the release behavior.⁴⁷ They prepared three composite films based on fish gelatin and chitosan in which they incorporated ϵ -PLL and compared ϵ -PLL release from the films without crosslinker, and with glutaraldehyde and cinnamaldehyde as respective crosslinkers. ϵ -PLL was more entrapped with the glutaraldehyde than with the cinnamaldehyde crosslinker due to a strong reaction between the aldehyde functions of glutaraldehyde and the amine functions of chitosan, resulting in a slower release of ϵ -PLL. With the cinnamaldehyde crosslinker, ϵ -PLL was released at a very fast rate at the beginning, yet with a decrease after 16 hours due to a smaller crosslinking of the film. Thus, the release of ϵ -PLL, and so the antibacterial activity, can be controlled, which can be interesting to develop materials with a specific release profile.

Antibacterial properties were also obtained from a starch- ϵ -PLL composite.⁸⁵ First, a starch paste was made by gelation in water, to which ϵ -PLL in solution was added, and finally poured on framed glass plates. These films were effective against *E. coli* and *B. subtilis*.

1.2.5. Coating surfaces with ϵ -PLL

ϵ -PLL is increasingly used to coat materials for medical applications, conferring them antibacterial and antifungal properties.

1.2.5.1. Coating of nanoparticles

As previously reported, nanoparticles are widely used for medical applications to deliver drugs and antibiotics. More local and stronger antibacterial effects at the infection's site can actually be achieved using nanoparticles. These kinds of systems are also interesting because of the possibility of adding different drugs to the nanoparticles, which can prevent bacterial resistance to antibiotics. The efficacy of some antibiotics, such as vancomycin, can be further improved by adding ϵ -PLL thanks to synergetic effects between the drug and the homopolymer.^{86, 87}

1.2.5.1.1. Coating of mesoporous silica nanoparticles

Among nanoparticles, mesoporous silica nanoparticles are arousing great interest as drug delivery systems, as they improve the solubility and stability of drugs. Furthermore, the quantity of drugs coated on the silica nanoparticles can be decreased while achieving the same results as with locally delivered drugs alone. Finally, they are easy to set up, a wide range of parameters can be controlled, and their surfaces are easily functionalizable.⁷²

Mesoporous silica nanoparticles loaded with vancomycin can be capped with ϵ -PLL via electrostatic interactions so as to improve the system's antibacterial properties.⁸⁸ Thanks to the synergistic effect between vancomycin and ϵ -PLL, but also to the mesoporous structure of the nanoparticles, the amount of ϵ -PLL necessary for inhibiting the infection is low and the efficacy of vancomycin on gram-negative bacteria is improved.

Mesoporous silica nanoparticles capped with ϵ -PLL in a covalent manner can also be used to control the drug release.⁸⁹ In a study by Mondragon *et al.*, ϵ -PLL was covalently anchored to the nanoparticle surface via the formation of urea bonds and the specific reaction between the terminal carboxyl function of ϵ -PLL and the azide functions of the azidopropyl-functionalized nanoparticles. The release of the nanoparticles from the system varies depending on the way ϵ -PLL was attached to the surface. Nanoparticles capped with ϵ -PLL that was randomly anchored to the surface indeed present a faster release compared to nanoparticles with ϵ -PLL attached by one end of the polymeric chain to the surface. Further, the release of the active components from the mesoporous nanoparticles is nearly zero in water because of the

presence of ϵ -PLL that blocks the delivery. However, if a protease is added to the medium, the amide bonds of ϵ -PLL get hydrolyzed, thereby allowing the active components loaded inside the nanoparticles to be released. Those systems have interesting properties for cancer treatment for instance.

ϵ -PLL has also been used on a mesoporous bioactive glass support, a bioceramics that can be used for skeletal regenerative therapies, to develop loaded devices for bone cancer and bone infection treatments.⁹⁰ Antibiotic and antitumor drugs were loaded, and the release was controlled thanks to an enzyme-responsive mechanism attributable to the presence of a proteolytic enzyme or alkaline phosphatase (ALP) in the medium. In the presence of bacterial proteases, the amide bonds get hydrolyzed, inducing drug release in the system.

ϵ -PLL displays antibacterial activity against both gram-positive and gram-negative bacteria, but also antifungal properties. Synergistic effects with antifungal drugs such as itraconazole may improve the efficacy of both components, while decreasing the emergence of drug resistant fungal strains.⁹¹ Song *et al.* have developed mesoporous silica nanoparticles for treating *A. fumigatus* infection. They coated their nanoparticles with ϵ -PLL and loaded them with itraconazole. Finally, they tested the antifungal properties of their nanoparticles and the release of itraconazole. They found out that a smaller concentration of itraconazole was required to inhibit the fungal growth on agar plate when the molecule was loaded inside the nanoparticles with ϵ -PLL compared to the loading of itraconazole alone. In addition, the use of mesoporous silica nanoparticles improves the solubility of itraconazole, which is lipophilic in aqueous medium.

ϵ -PLL-capped nanoparticles can thus be used to improve selectivity and efficacy of drugs loaded inside nanoparticles.⁹² These systems are safe and promising for various medical applications.

1.2.5.1.2. Coating of polymer and protein nanoparticles

Polymers can also be used to form nanoparticles. The stability and loading capacity of polymer nanoparticles can be improved by coating their surface with various polycations.⁹³ For example, poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles can be coated with polycations such as ϵ -PLL. The surface modification that adds positive charges also makes it possible to load a higher concentration of antigen inside the PLGA nanoparticles. The nanoparticles proved to be more stable and to enhance lymphocyte proliferation. They also increased cytokine secretion that induced the immune response. Thus, this system is interesting for antigen delivery applications.

PEG is well studied for medical applications, because of its biocompatibility, its antifouling properties, and its capacity to retain water due to its hydrophilic properties.⁹⁴ PEG- and ϵ -PLL-

based nanoparticles have been developed.⁵⁰ For these materials, ϵ -PLL was first modified with mercaptopropionic acid to add thiol functions and then mixed with PEG functionalized with maleimide functions to bind the two polymers via a thiol-maleimide reaction. Finally, the nanoparticles were obtained by adding dropwise the previous product dissolved in dimethyl sulfoxide to a PBS buffer. Breast cancer drugs, such as doxorubicin and lapatinib, can also be added to the nanoplatform before the formation of the nanoparticles. Doxorubicin was grafted to the nanoparticles, whereas lapatinib was loaded inside them. These nanocarriers were pH-dependent, with reverse charge change in acidic environment. Cell internalization and nanoparticle penetration inside cells can therefore be easier because of this property and the acidic tumor medium.

Shi *et al.* studied insulin nanospheres functionalized with ϵ -PLL for pulmonary delivery of insulin thanks to the use of PEG.⁹⁵ First, bulk porcine insulin was added to a PEG/PVA solution. Then, the suspension was centrifuged and resuspended in PVA solution. Finally, the surface of these nanoparticles was modified with ϵ -PLL using an ionic shell crosslinking procedure based on the physical crosslinking of the ϵ -PLL positive charges and the negative charges of a salt, sodium tripolyphosphate. The modification of the surface of insulin nanoparticles with ϵ -PLL was associated with an improved bioavailability and insulin absorption in the lung and alveoli over time.

Protein nanoparticles have been studied for drug administration in other therapeutic applications. Proteins like bovine serum albumin (BSA) were used to synthesize nanoparticles with epigallocatechin gallate (EGCG) loading.⁹⁶ ϵ -PLL-coated nanoparticles displayed a higher loading efficiency (35.4%) compared to uncoated nanoparticles (32.3%), with a better stability in acidic pH. However, ϵ -PLL coating delays EGCG release from BSA nanoparticles.

β -lactoglobulin proteins were also studied to design drug delivery systems.⁹⁷ Bovine β -lactoglobulin and succinylated β -lactoglobulin can be crosslinked with ϵ -PLL to develop a pH-responsive drug carrier. Curcumin was loaded inside the colloidal drug carrier, which improved its solubility and anti-inflammatory activity by decreasing inflammatory cytokine secretion. Finally, this system was applied as an oral drug delivery system, showing that the colloid nanoparticles protect the drug from acidic medium conditions.

1.2.5.1.3. Cyclodextrin nanoassemblies

Other systems can be used as drug carrier to improve the solubility of drugs. For instance, cyclodextrins are cyclic oligosaccharides with a hydrophilic external face.⁹⁸ Inside the cycle, apolar molecules can be loaded, thereby increasing their solubility in water.⁹⁹ Thus, these systems are interesting for drug delivery.

Choi *et al.* have studied properties of various cyclodextrins conjugated with ϵ -PLL.^{100, 101} They developed supramolecular complexes with a reversible sol-gel transition according to the pH and temperature. In their studies, they grafted ϵ -PLL on the external surface of the cycles and added a negative compound inside the cyclodextrin. A large number of active components can be loaded as guest molecules, with the possibility to control their release depending on the environment. For instance, plasmid DNA was loaded inside the cyclodextrins and delivered for gene therapy applications. Cyclodextrins can thus be used as an intracellular trafficking device.

Scutellarin, a protease inhibitor active against SARS-CoV-2, can be loaded inside a cyclodextrin system.⁹⁸ A main chain of ϵ -PLL was employed to covalently attach a large number of glycine- β -cyclodextrin particles. Then, scutellarin, which has low water-solubility, was loaded as guest molecule inside these cyclodextrin particles. This ϵ -PLL/cyclodextrin system improved the stability of the drug, which can be better endocytosed by cells thanks to the particle size and their surface charge.

Cyclodextrins and ϵ -PLL can also be used to prepare polyelectrolyte complexes. Due to the positive charges of ϵ -PLL and negative charges of β -cyclodextrin sulfate, a complex can form, with electrostatic interactions between both compounds, and some proteins such as lysozyme, lactoferrin, actinidin, and albumin can be loaded inside the system.¹⁰² Then, the protein-containing cyclodextrin complexes can be administrated orally, with an improved intestinal absorption of large molecules.

1.2.5.1.4. Micro- and nanocomplexes

In the last decades, other nanocomplexes such as microcapsules were studied for their ability to encapsulate drugs or cells. Alginate can be used to form microcapsules with ϵ -PLL using a salt and a high-voltage electrostatic generator.¹⁰³ The membrane thickness and swelling behavior can be modified depending on the synthesis parameters. Cells can be encapsulated inside, with improved cell viability over time. Shi *et al.* studied microcapsule suspensions using a sonochemical method.¹⁰⁴ In this work, the microcapsule barrier was formed by coupling folic acid and ϵ -PLL preliminary dissolved in an aqueous phase, while coumarin-6, a hydrophobic green dye used as a model of hydrophobic drug, was dissolved into an oil phase to be encapsulated into the microcapsule. Accordingly, microcapsules are interesting for loading hydrophobic drugs and locally targeting and controlling their release in cancer therapy.

Magnetic nanoparticles have also been extensively studied for various medical applications, mostly for cancer treatment or imaging, due to the possibility to target their delivery.¹⁰⁵ Magnetic nanoparticles can then be functionalized with polymers and peptides to add different properties. For instance, Meikle *et al.* developed magnetic nanoparticles functionalized with ϵ -PLL dendrons.¹⁰⁶ The possibility of controlling the nanoparticle location using a magnet is of

advantage. These nanoparticles can bind vascular endothelial growth factor (VEGF) and control its release.

Cubosomes, which consist of a liquid-crystalline structure and a lipid bilayer membrane, are increasingly explored as drug delivery systems.¹⁰⁷ A single layer of ϵ -PLL can modify the particle surface due to the ϵ -PLL positive charges that interact with the negative surface of the cubosomes. The coating was shown to improve the system stability.¹⁰⁸ Further, cubosomes were loaded with the non-steroidal anti-inflammatory drug naproxen and hydrophobic dyes. The coated and loaded cubosomes did not present any cytotoxicity and showed better anticancer properties as compared to non-encapsulated drugs.

1.2.5.2. Coating of metals

A large number of implant surgeries are performed every year across the world. In 2016, however, 16% of surgeries were reported to be associated with infection in Europe.¹⁰⁹ Coating implants with antibacterial molecules is interesting to prevent infection and so implant failure. ϵ -PLL is a promising candidate to produce implant coatings.

Traditional implants are mostly made of metals. Titanium is often used for its mechanical strength and biocompatibility.¹¹⁰ Some studies added ϵ -PLL to the titanium surface. For example, Yang *et al.* developed a method to synthesize hyperbranched ϵ -PLL and to covalently immobilize it to the titanium surface.¹¹¹ The surface was first treated to become hydroxylated. Then, hyperbranched ϵ -PLL was covalently attached to the surface through the reaction between its amine functions and the epoxy function of the 3-glycidyloxypropyltrimethoxysilane that was added as a coupling agent between the titanium surface and ϵ -PLL. Antibacterial properties were demonstrated against the *S. aureus* and *E. coli* bacteria. The materials presented both strong antibacterial effects and enhanced osseointegration properties, with improved biocompatibility and better cell adhesion.

Layer-by-layer is another method to coat titanium implants. Electrostatic interactions between ϵ -PLL and gum Arabic, a natural highly biocompatible anionic molecule, can be used to obtain a layer-by-layer coating on titanium dioxide nanotube arrays firstly coated with polydopamine.¹¹² The increased number of bilayers enhanced the antibacterial properties against both gram-positive and gram-negative bacteria. Gum Arabic and ϵ -PLL have no cytotoxicity, which is of importance for clinical applications.

A crosslinking step can be added to stabilize the layer-by-layer coatings.⁴⁹ Polyethyleneimine (PEI) and PAA can be deposited to stainless steel surfaces. By adding furan groups to PAA and thiol to ϵ -PLL, the film can then be crosslinked via the Diels-Alder cycloaddition with

bismaleimide poly(ethylene glycol) as a crosslinker (**Figure 1.7**). The surface coatings proved to be antibacterial against *S. aureus* and *E. coli* and showed self-healable properties.

Grafting cobalt-chromium-molybdenum (CoCrMo) alloys with graphene oxide and ϵ -PLL was also studied for orthopedics and stomatology applications.¹¹³ ϵ -PLL and graphene oxide were deposited to the surface via electrodeposition. The coated surfaces presented antibacterial (via contact-killing mechanisms) and anti-adhesive properties.

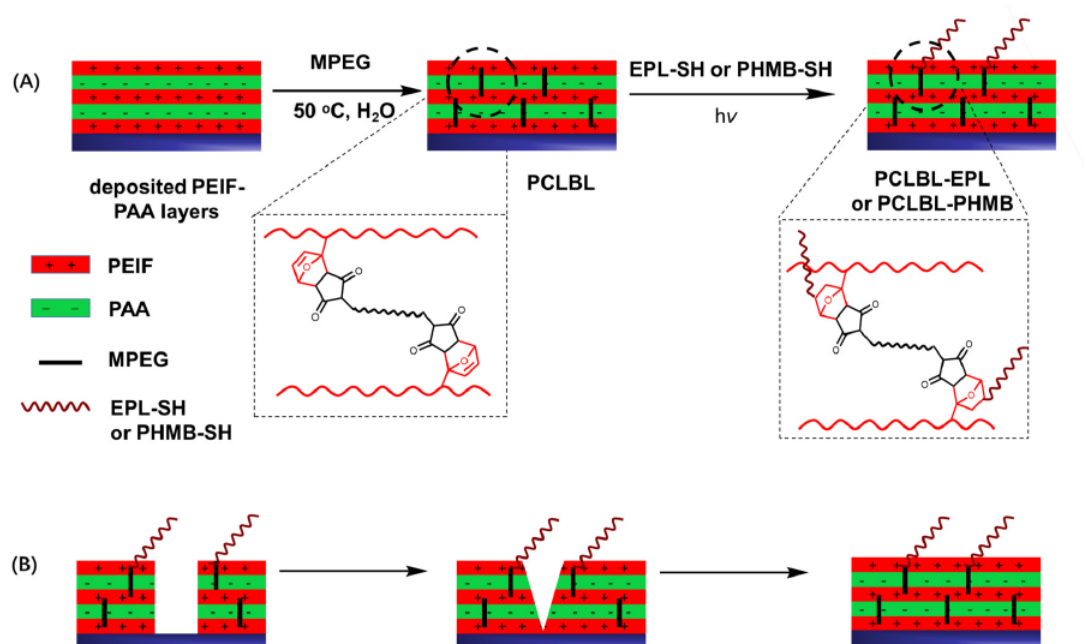


Figure 1.7. Multilayer coating of stainless steel. The layer-by-layer technique was used to deposit layers of modified PEI and PAA. Then, the coating was crosslinked via the Diels-Alders cycloaddition. Finally, a thiol-ene click reaction was used to attach poly-hexamethylene biguanide (PHMB) or ϵ -PLL to the surface. This kind of coating exhibited strong antibacterial properties against gram-positive and gram-negative bacteria and was not cytotoxic. Reproduced with permission.⁴⁹ Copyright 2021, Elsevier.

1.2.5.3. Coating of polymers

Polymers are commonly used as medical devices. For example, thermoplastic polyurethane (PU) is used for catheters.⁴³ ϵ -PLL can be used to coat PU catheters by forming a complex with an anionic surfactant, 1,4-bis(2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate, that is added dropwise to a ϵ -PLL solution. Complexation results from the electrostatic interactions between ϵ -PLL and the surfactant. Then, the catheter is coated by immersing it into the solution containing the complex previously formed. A significantly decreased bacterial growth and adhesion were observed. Additionally, *in vivo* experiments showed that the infection-related inflammatory response was inhibited with the coated catheter. ϵ -PLL coating of medical devices therefore appears very promising to prevent infections.

Catheters based on polydimethylsiloxane (PDMS) are also commonly used in the medical field.¹¹⁴ Surface initiated supplemental activator and reducing agent atom transfer radical polymerization (SI-SARA-ATRP) was used to coat the surface with cationic polymers. The PDMS catheter was first modified with dopamine and then α -bromoisobutyryl bromide (BiBB) to activate the surface. Subsequently, ϵ -PLL modified with methacrylic acid, diallyl dimethyl ammonium chloride (DADMAC), and polyethylene glycol dimethacrylate (PEGDMA) was crosslinked at the catheter surface.

Other materials can be coated with ϵ -PLL. For instance, the surface of a 3D scaffold composed of polycaprolactone (PCL) and hydroxyapatite (HA) was designed by fused deposition modeling (FDM).¹¹⁵ Then, the scaffold was modified with ϵ -PLL by pouring the material in a ϵ -PLL solution. Adding the cationic polymer improved the biocompatibility and osteoconductivity, with osteogenic differentiation. The surface also presented antimicrobial properties. *In vivo* experiments on rabbits were conducted to check the effect of the scaffold on immunogenic reaction and bone defect repair function.¹¹⁶ With this added coating, pro-inflammatory markers were decreased, while anti-inflammatory markers were increased. In addition, the bone repair capacity seemed to be faster when the scaffold was coated with ϵ -PLL. This indicates that ϵ -PLL has an impact on the inflammatory reaction and on tissue regeneration and modulation.

Tissue healing can alternatively be favored by using surgical adhesives. A layer-by-layer adhesive film was developed by Wang *et al.*, consisting of layers of catechol-modified ϵ -PLL and of dopamine hydrochloride-modified sodium hyaluronate.¹¹⁷ The first layer was made of catechol-modified ϵ -PLL, to which a layer of dopamine hydrochloride-modified sodium hyaluronate was then added. The number of deposited bilayers can be chosen. Finally, the obtained film was crosslinked with N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimide hydrochloride (EDC) to improve the mechanical properties of the coating. The film showed good adhesion and biocompatibility. Besides, the adhesion properties were assessed using a lap shear testing process, revealing that the film's adhesion properties depend on the number of deposition layers and are greatest for 150 bilayer depositions. In this configuration, the film presented strong adhesion properties, which is critical when developing surgical adhesives.

Cellulose is another biopolymer of interest for the development of wound dressings. The cellulose membrane is easily functionalized with ϵ -PLL to improve the antibacterial properties of some materials.¹¹⁸ No cytotoxicity was observed after the application of the coating due to the biocompatibility of ϵ -PLL. The mechanical properties of the cellulose membrane remained unaffected. Cellulose was also studied by Tavakolian *et al.*¹¹⁹ They constructed a hydrogel by modifying cellulose fibers in carboxymethyl cellulose fibers and by crosslinking with epichlorohydrin. Finally, ϵ -PLL was grafted to the surface of the hydrogel through the reaction

between amine and carboxylic groups. This hydrogel exhibited strong antibacterial properties against gram-positive and gram-negative bacteria.

Thus, coating material surfaces with ϵ -PLL improves their biocompatibility, but also provides the materials with antimicrobial, anti-inflammatory, or osseointegration properties.

1.2.6. ϵ -PLL for hydrogel synthesis

Hydrogels are very promising for medical applications due to their 3D network that is able to retain a large amount of water.¹²⁰ Furthermore, plenty of methods can be implemented to develop hydrogels with natural polymers and components. Hydrogels have thus been subject to numerous studies to solve various issues, such as wound healing promotion and drug delivery.¹²¹

1.2.6.1. Hydrogels based on Schiff base

Schiff base reaction has been widely used for synthesizing hydrogels for biomedical purposes. This reaction relies on click chemistry between amine and carboxyl functions, and hydrogel networks can be developed using this method combined with polymers.^{122, 123} The dynamic nature of Schiff base linkages confers some self-healing properties to the hydrogel. Finally, the instability properties of Schiff bases are also interesting for various biomedical applications, such as biosensor, drug delivery, wound healing, and even bioprinting.

Polysaccharides, such as dextran, can be oxidized into aldehyded dextran using sodium periodate to develop Schiff base hydrogels with ϵ -PLL.¹²⁴ The aldehyded dextran can react with the ϵ -PLL amine function to form medical adhesives.¹²⁵ These hydrogels can be used as adhesive and glue and to decrease the infection risk.^{126, 127} For example, the hydrogels developed by Hyon *et al.* between aldehyded dextran and ϵ -PLL showed low cytotoxicity on L929 mouse fibroblast cells due to the absence of crosslinker and to the non-cytotoxic polymers used for the development of the hydrogels.¹²⁸

Another hydrogel was developed using the same reactions.¹²⁹ The reaction between the carbonyl function of aldehyded dextran and the amine functions of ϵ -PLL formed a powder that can be transformed in glue by adding water. Then, vancomycin can be added to be released later from the hydrogel to decrease methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections.

Aldehyded dextran- ϵ -PLL biodegradable hydrogels can also be employed for gene therapy.¹³⁰ The degradation speed of these hydrogels, and thus the transfected gene release, can be controlled.

This kind of hydrogels can also be interesting for wound healing.¹³¹ For such applications, basic fibroblast growth factors (bFGF) have been incorporated inside the hydrogels and released to

improve endothelial cell migration and promote wound healing. The hydrogels were also found to be antibacterial against gram-positive bacteria and gram-negative bacteria, and to have antifungal properties, which is essential for wound care and infection risk reduction.

ϵ -PLL carbon dots can be formed by pyrolysis of ϵ -PLL.¹³² Using Schiff base reaction, the hydrogel's 3D network can be constructed between ϵ -PLL carbon dots and aldehyded dextran. This technique locally increases the number of amine functions and shows strong antibacterial properties. This hydrogel was injectable, which is of interest for wound healing applications.

More complex systems have been designed based on aldehyded dextran and ϵ -PLL. For instance, Yang *et al.* proposed to modify ϵ -PLL with carboxylated PVA, mixed with chitosan, while using oxidized dextran as a crosslinker.¹³³ Schiff base reactions between ϵ -PLL and chitosan with dextran led to the formation of the 3D network. Finally, silver nanoparticles were loaded into the hydrogels. The hydrogels were macroporous and presented antibacterial properties, due to both ϵ -PLL and silver nanoparticles. These hydrogels promoted wound healing, making them interesting for wound therapy.

Pullulan, another polysaccharide, can be used for developing hydrogels with ϵ -PLL via Schiff base reaction.¹³⁴ In order to decrease the gelation time, branched PEI was also added to the hydrogels. The combination of branched PEI and ϵ -PLL facilitated the hydrogels' formation and optimized their stability. The hydrogels were biocompatible and responded to various external stimuli. In addition, drugs could be loaded inside them to provide various properties.¹³⁵ For instance, doxorubicin and cisplatin were loaded inside the 3D network to deliver chemotherapy against Huh-7 cells.

Other polymers can be used to synthesize ϵ -PLL-based hydrogels. PEG can be functionalized to form aldehyded PEG, which then reacts with the amine functions of ϵ -PLL to produce a 3D crosslinked network (**Figure 1.8**).¹³⁶ The arginine-glycine-aspartic acid (RGD) peptide can be loaded via covalent bonds due to its primary amine functions. The addition of this peptide to the hydrogels improves cell adhesion. This material presented low cytotoxicity and good mechanical properties, which is promising for cell culture applications.

Finally, copolymers were also studied to develop ϵ -PLL-based hydrogels. Pluronic F127 is a copolymer surfactant used as an antifoaming agent. Multifunctional hydrogels based on this polymer and on ϵ -PLL were studied.¹³⁷ The hydrogels were formed between pluronic F127 and ϵ -PLL, following which monodispersed polydopamine-functionalized bioactive glass nanoparticles were loaded into the hydrogels and linked via Schiff base reaction. The hydrogels displayed antibacterial and wound healing properties, with an additional photothermal killing effect on melanoma cells achieved thanks to the addition of these nanoparticles. These hydrogels are therefore very promising for skin cancer therapy.

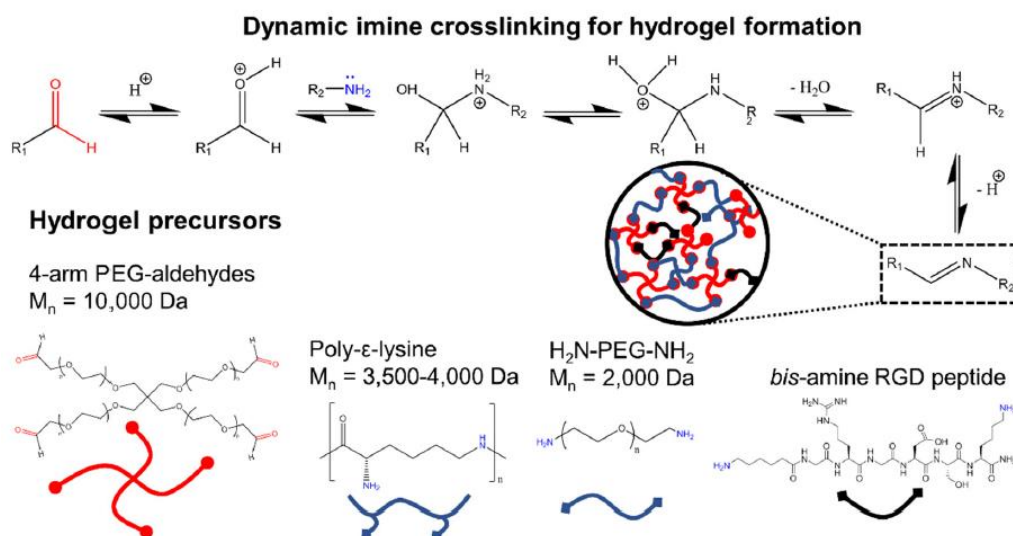


Figure 1.8. Mechanism of Schiff base reaction for developing a hydrogel based on aldehyded PEG and ϵ -PLL. The hydrogel formation resulted from the formation of imine bonds that can be easily broken and reformed depending on the environment. Peptides such as arginine-glycine-aspartic acid peptides can be chemically grafted inside the hydrogel network to improve cell adhesion. Reproduced with permission. ¹³⁶ Copyright 2020, MDPI.

1.2.6.2. Mussel-inspired adhesives and hydrogels

Mussel-inspired chemistry has attracted a great deal of research interest for developing adhesives and hydrogels with good adhesion properties under wet conditions.¹³⁸ These properties are based on the catechol groups of molecules, such as dopamine, gallic acid, or even tannic acid.¹³⁹ Mussel-inspired hydrogels boast numerous advantages, such as self-healing properties, strong wet adhesion, biocompatibility, and antioxidant properties.

Catechol can be directly used with ϵ -PLL to form hydrogels.¹⁴⁰ First, both the catechol and ϵ -PLL were incubated at 37°C to partially oxidize the catecholamine. Then, the reaction mixture was placed at 4°C for 2 days to form the hydrogels. The resulting hydrogels presented antibacterial and antibiofilm properties, without being cytotoxic. *In vivo*, the application of these hydrogels on burn wounds decreased the bacterial burden.

A mussel-inspired catechol/polyamine reaction can be obtained between polydopamine and ϵ -PLL.¹⁴¹ The hydrogels were formed by partial oxidation of the catecholamine via oxidative crosslinking between ϵ -PLL and catechol.¹⁴⁰ Thus, hydrogels were easily formulated under soft conditions, exhibiting strong antibacterial properties against gram-positive and gram-negative bacteria and against biofilms. Furthermore, *in vivo* burn wound infections were studied in a mouse model. Adding the hydrogel prevented infections, but also improved wound healing and

VEGF secretion. In addition, the secretion of pro-inflammatory cytokines was reduced. All these results, together with the good biocompatibility, make these hydrogels very promising for application in wound dressings.

Polydopamine also presented good photothermal properties. Thus, an agarose-based hydrogel was developed with the addition of polydopamine and ϵ -PLL inside the 3D network for wound healing properties.¹⁴² ϵ -PLL was used to capture polydopamine inside the agarose network through interactions between the amine groups and catechol. Polydopamine provides these hydrogels with photothermal functionality, with the ability to fight bacterial infection and inflammation in a wound.

Catechol and polymers can also be combined to develop tissue adhesives based on a mussel-inspired strategy. Li *et al.* proposed to functionalize hyaluronic acid with catechol using dopamine in order to develop the adhesive.¹⁴³ ϵ -PLL was also modified with 3-(3,4-dihydroxyphenyl)propionic acid to obtain a catechol-modified ϵ -PLL. It was then coordinated with Fe^{3+} to load metal ions inside the gelled adhesive. Using this method to load Fe^{3+} facilitated the incorporation of these ions inside the material and improved the adhesive properties of the material.

Other studies were conducted on mussel-inspired hydrogels for wound healing applications. Biocompatible polymers can be used to form the hydrogel, with the possibility of subsequently adding dopamine thanks to the amine functions of ϵ -PLL.¹⁴⁴ PEG is widely used in hydrogels because of its properties, as previously described. PEG and ϵ -PLL were conjugated to produce a hydrogel with strong wound healing, biocompatible, and adhesive properties. The addition of catechol improved the hydrogel's wet adhesion properties. Finally, *in vivo* experiments showed promising results for the use of this material as an adhesive in wound healing applications.

Hydroxybutyl chitosan (HBC) is another polymer that has been studied for mussel-inspired adhesive formation.¹⁴⁵ HBC is thermosensitive, meaning that it is in solution at low temperature (approx. 4°C) and forms a hydrogel at 37°C. The amine functions of HBC were shown to react with the carboxyl groups of ϵ -PLL and L-dopamine to fix these molecules inside the hydrogel. For promoting wound healing, bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) can be loaded inside the hydrogel, which can then be injected *in situ* (**Figure 1.9**). These L-dopamine- and ϵ -PLL-based hydrogels presented an almost 1.5-fold increase in wet adhesion strength. Furthermore, fibroblast migration and growth factor secretion were improved thanks to the encapsulation of BMSCs.

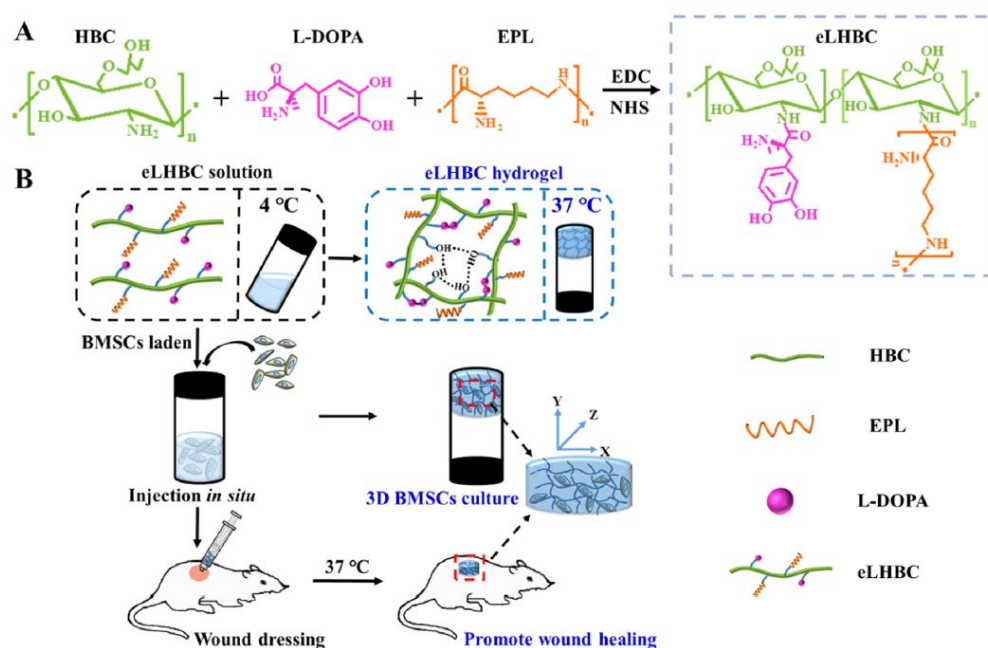


Figure 1.9. A) Schematic representation of the reaction between the amine function of HBC and the carboxyl groups of L-dopamine and ϵ -PLL. B) This initially synthesized molecule can then form a hydrogel through the formation of hydrogen bonds at 37°C. Moreover, it was easy to encapsulate cells inside the hydrogel networks before gelation and to inject the solution into rat wounds for promoting wound healing. Reproduced with permission. ¹⁴⁵ Copyright 2021, Elsevier.

1.2.6.3. Carbodiimide chemistry between ϵ -PLL and fatty acids

ϵ -PLL-based hydrogels can be developed using bis-carboxylic fatty acids as crosslinkers due to the reaction between amines and carboxyl functions.¹⁴⁶ Various bis-carboxylic acids can be employed to crosslink ϵ -PLL in the formation of a 3D network, while the percentage of crosslinker can be modulated.⁴⁴ Polymer density is another parameter that can be controlled when forming hydrogels with carbodiimide chemistry. These three parameters therefore determine the properties of the materials. The porosity, swelling ratio, and mechanical properties of the hydrogels can be chosen depending on the applications, which is of great importance when developing materials for corneal regeneration.

For instance, such hydrogels can be used as contact lens materials due to their water-retaining capacity and can then be loaded with antibiotics and antifungals by dipping.¹⁴⁷

Functionalization of ϵ -PLL-based hydrogels crosslinked with octanedioic acid was also studied.¹⁴⁸ A cell-binding peptide was synthesized and attached to the surface of the hydrogels. The peptide was covalently bonded to the hydrogels with octanedioic acid. These hydrogels showed strong antibacterial properties against gram-negative *P. aeruginosa* bacteria when ϵ -PLL was covalently bonded to the free amine of the hydrogels.¹⁴⁹ The addition of ϵ -PLL further

improved cell adhesion and proliferation of corneal endothelial cells. These hydrogels also presented amoebicidal activity, as reported by Kennedy *et al.*¹⁵⁰

1.2.6.4. ϵ -PLL/chitosan hydrogels

Chitosan is a natural polysaccharide that has been widely studied for its biocompatibility and antibacterial properties.¹⁵¹ Moreover, chitosan can easily be modified, functionalized, chemically crosslinked for developing a biomaterial. For example, carboxymethyl chitosan can be prepared to increase the water solubility biocompatibility of chitosan.¹⁵² Carboxymethyl chitosan and ϵ -PLL were mixed together so that the reaction between the carboxyl groups and amine functions can form amide bonds.¹⁵³ The electrostatic interaction between negative and positive charges of the polymers promoted gelation. The resulting hydrogel was injectable and showed self-degradation properties, in addition to bacteriostatic properties and low cytotoxicity.

Chitosan can be functionalized into quaternized chitosan to improve the macromolecule's antibacterial properties. First, chitosan was modified with glycidyl trimethyl ammonium chloride and phosphorylated chitosan.¹⁵⁴ Thereafter, chitosan was formulated into hydrogels using a freeze-drying method, which consisted in adding ϵ -PLL and tannic acid to chitosan, followed by washing and lyophilization. The hemostatic efficacy of hydrogels was tested and compared to a commercial pad. Cytotoxicity was also assessed on mouse fibroblasts. The hydrogels were stable over 7–14 days and did not present any cytotoxicity *in vivo*. The designed chitosan/ ϵ -PLL hydrogels exhibited better hemostatic efficacy and lower cytotoxicity as compared to the referenced commercial materials, yet they were less efficient for bacteria killing.

Michael addition is a method widely used to crosslink hydrogels. The thiol-maleimide reaction is easy and fast. Hence, chitosan can be functionalized with thiol functions and ϵ -PLL with maleimide groups to synthesize a hydrogel with fast gelation kinetic.¹⁵⁵ Since only two natural polymers were used, the materials showed good biocompatibility, in addition to strong adhesion properties, all of which are promising for the development of new adhesives.

1.2.6.5. Enzymatically crosslinked ϵ -PLL hydrogels

Another method to crosslink hydrogels relies on the use of enzymes, which enables to control the physico-mechanical properties of the hydrogels and to enhance biocompatibility, biodegradability, and other interesting properties for various biomedical applications.¹⁵⁶

Hydrogels based on polymers such as PEG and crosslinked with enzymes have been studied. PEG was modified with p-nitrophenyl chloroformate to functionalize both sides of the PEG chains.¹⁵⁷ Then, ϵ -PLL reacted with these functions in the presence of tyramine to form the ϵ -

PLL-PEG-tyramine conjugate. Finally, horseradish peroxidase and hydrogen peroxide were added to enzymatically crosslink the hydrogels. Depending on the concentration of hydrogen peroxide, crosslinking can be modified, thereby enabling to control the mechanical properties of the biomaterials. The hydrogels additionally showed fast gelation and no cytotoxicity.

Horseradish peroxidase and hydrogen peroxide were also employed to enzymatically crosslink hydrogels based on ϵ -PLL/hydroxyphenylpropionic acid conjugate.⁴² The enzyme catalyzed the polymerization between the conjugates based on an oxidation process that coupled two modified ϵ -PLL by their phenol functions. This method led to fast hydrogel formation, with the possibility of controlling gelation time. The hydrogels proved biocompatible and antibacterial against both gram-negative and gram-positive bacteria. Finally, they exhibited high adhesive strength in the lap shear test with porcine skin.

Other enzymes were studied to enzymatically crosslink hydrogels. For instance, Zhu *et al.* developed a hydrogel based on gelatin and ϵ -PLL using transglutaminase to form bonds between ϵ -PLL and gelatin.¹⁵⁸ Besides, cucurbit[7]uril, a macrocyclic cage, was used in addition to ϵ -PLL to deliver the antibacterial and hemorheological properties. The reaction between ϵ -PLL and cucurbit[7]uril and between gelatin, ϵ -PLL, and transglutaminase was performed in one-pot with PBS. The final hydrogels had not only good antibacterial and hemorheological properties, but were also biocompatible and displayed appropriate mechanical properties for biomedical applications.

1.2.6.6. ϵ -PLL hydrogels based on electrostatic interactions

ϵ -PLL is positively charged at physiological pH. Consequently, it can be used for developing materials with a negatively charged polymer via electrostatic interactions. For example, gellan gum is a polysaccharide that is negatively charged at physiological pH. Gellan gum- ϵ -PLL-based hydrogels have been developed based on the electrostatic interactions between the positive charge on the ϵ -PLL amine groups and the negative charge on the gellan gum carboxylate functions, thereby forming a 3D network.¹⁵⁹ The hydrogels were not cytotoxic due to natural peptides being used. Thus, the electrostatic interactions between two natural polymers are interesting for the development of biocompatible biomaterials.

Hyaluronic acid is a polymer that has been exhaustively studied for medical applications because of its intrinsic properties, such as biocompatibility, antifouling effects, and wound healing promotion. This negatively charged polysaccharide has been explored for the development of hydrogels.¹⁶⁰ Hyaluronic acid- and ϵ -PLL-based hydrogels have been developed by taking advantage of these physical interactions.¹⁶¹ Hydrogels crosslinked via physical interactions showed stronger antibacterial properties against gram-negative bacteria

than chemical hydrogels based on the covalent links between amine functions and carboxyl groups. However, cell viability was better for the chemically crosslinked hydrogels. This indicates that the crosslinking process plays a major role in the final properties of hydrogels.

1.2.6.7. Dual network hydrogels containing ϵ -PLL

Dual network hydrogels are promising materials with strong mechanical properties and high stability. They possess two interpenetrating crosslinked networks rendering them tougher than single network hydrogels.

For example, Schiff base reaction was used in combination with an enzyme-induced strategy for hydrogel formation.¹⁶² A first hydrogel was prepared using ϵ -PLL combined with 1-vinyl-2-pyrrolidinone (NVP) and N-methylol acrylamide (NMA). It was subsequently placed in contact with plasma amine oxidase (PAO) to oxidase the ϵ -PLL primary amines. These new functions then reacted with the non-oxidized primary amines to form imine bonds via Schiff base reaction. This dual network development strategy conferred antibacterial, wound healing, and good self-healing properties to the hydrogels.

Other systems are based on a first network crosslinked with UV light and a second network formed by hydrogen bonding (**Figure 1.10**).¹⁶³ A first hydrogel network was built with ϵ -PLL functionalized with methacrylic acid. The new functions could react with each other in the presence of a photo-initiator and UV light. This first hydrogel network was then immersed in a tannic acid solution. This second step resulted in hydrogen bonds, forming the second network between tannic acid and methacrylate ϵ -PLL. Furthermore, using tannic acid increased the antibacterial properties of the hydrogel.

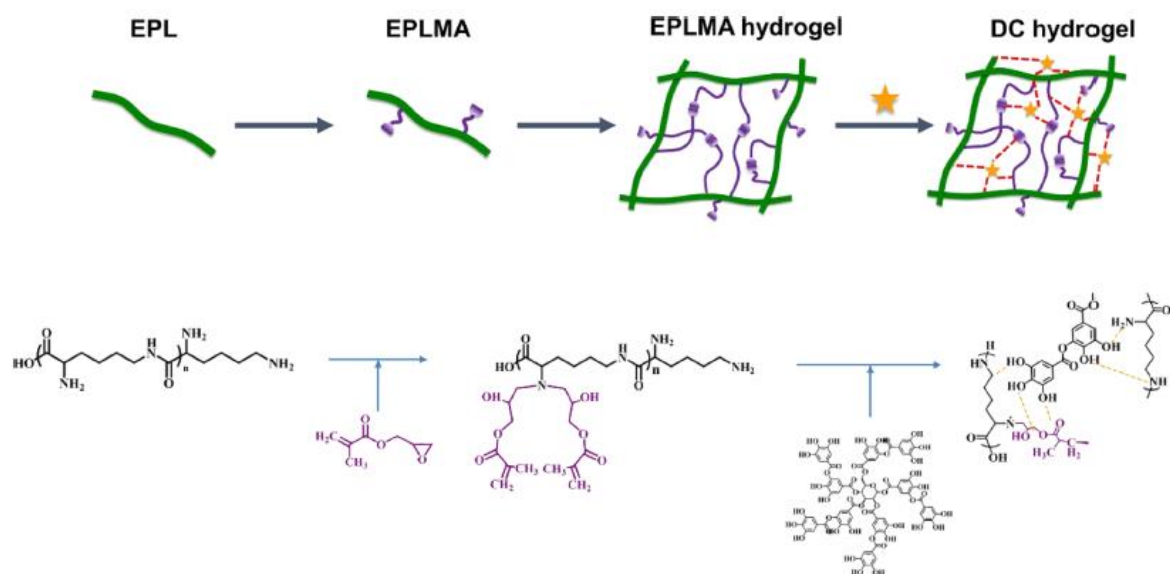


Figure 10. Schematic representation of the dual network hydrogel formation based on the ϵ -PLL methacrylate reaction with a UV photo-initiator and the complexation of ϵ -PLL with tannic acid leading to hydrogen bonding. EPL represents ϵ -PLL, EPLMA represents the ϵ -PLL modified with methacrylic acid, and DC hydrogel represents the double crosslinked hydrogel based on the reaction between methacrylate functions and the hydrogen bonding between tannic acid and EPLMA. Reproduced with permission.¹⁶³ Copyright 2021, ACS Publications.

1.2.6.8. Other hydrogel systems

As previously reported, PEG is extensively used in medical sciences, and more precisely for the development of hydrogels. This polymer can be modified and functionalized in several ways to change its reactivity to different molecules. To graft ϵ -PLL to PEG, the latter was functionalized with diglycidyl ether.¹⁶⁴ Poly(DVBAPS-*co*-GMA) was also added to the reactive mixture to form the 3D network. Hydrogels were then obtained through the reaction of the hydrogels with glycidyl trimethylammonium chloride. Adding this last step improved the antibacterial properties without increasing the cytotoxicity. Moreover, these materials promoted cell proliferation and adhesion.

PEG diacrylate was also studied with ϵ -PLL methacrylic acid and N,N-dimethyl acrylamide using a photo-initiator to crosslink the hydrogel with UV light.¹⁶⁵ The hydrogel had good antimicrobial and antifungal properties and proved biocompatible based on the results obtained with keratinocytes.

Numerous methods have been used to develop hydrogels with ϵ -PLL. In most of the studies, the presence of ϵ -PLL in the hydrogel network improved the properties of the materials, *i.e.*, the mechanical and/or antibacterial properties. There are many ways to form hydrogels, leading to variable properties, with promising applications in the field of medical devices.

1.2.7. Conclusion and perspectives

Over the past decade, a growing number of studies have focused on the use of ϵ -PLL for medical applications. As a natural molecule, ϵ -PLL exhibits very low cytotoxicity. Moreover, due to its antibacterial, antifungal, and wound healing properties, ϵ -PLL is increasingly being studied for the development of biomaterials. Indeed, by interacting with fungal and bacterial membrane through electrostatic interactions, the ϵ -PLL can disrupt the membrane, leading to the leakage of proteins and genetic materials. ϵ -PLL does not present selectivity against different pathogens and will be able to lyse a broad range of bacteria and fungi. This review described the recent studies on ϵ -PLL-based biomaterials for medical applications. Various chemistry reactions and processes can be employed with ϵ -PLL due to its structure and positive charge. ϵ -PLL also allows to synthesize different kinds of biomaterials, such as film coatings, adhesives, hydrogels, or nanoparticles. Some studies have proposed to encapsulate ϵ -PLL inside materials for drug delivery applications. The release of ϵ -PLL from nanoparticles, hydrogels, or films can be controlled thanks to pH- or temperature-sensitive systems, or even thanks to the degradation of the material. In addition, ϵ -PLL can be part of drug delivery systems, thereby allowing better control of drug release and leading to improved drug properties.

Various natural and synthetic polymers can be used in combination with ϵ -PLL to form materials with different properties, namely antibacterial, self-healing, self-degradation, wound healing, etc. Therefore, ϵ -PLL-based materials are very promising for various applications, such as biosensor, wound healing, gene delivery, cancer therapy, 3D printing, drug delivery, and tissue engineering.

Acknowledgments

This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 NOVA research and innovation program under grant agreement no. 101058554, from the Bio-Tune program under grant agreement no. 872869, and from the Région Grand Est through the ERMES project.

1.2.8. Supporting information

Table S1.1. *Various ϵ -PLL-based materials with interesting properties for biomedical applications.*

Material types	Composition	Properties	References
Nanoparticles	ϵ -PLL encapsulation into chitosan and sodium alginate nanoparticles	Good stability of ϵ -PLL and antibacterial properties	73
	ϵ -PLL encapsulation into chitosan and albumin nanoparticles	Increased antibacterial properties of ϵ -PLL	46

	ϵ -PLL encapsulation into poly(lactic acid) and poly(D,L-lactide)-co-poly(ethylene glycol) nanoparticles	Inhibition of pancreatic tumor cell proliferation	45
	Mesoporous silica nanoparticles capped with ϵ -PLL and loaded with vancomycin	Synergistic antibacterial properties between vancomycin and ϵ -PLL	88
	Azidopropyl-functionalized mesoporous silica nanoparticles capped with ϵ -PLL and loaded with camptothecin	Anticancer properties	89
	Mesoporous silica nanoparticles capped with ϵ -PLL and adenosine triphosphate and loaded with levofloxacin	Controllable release of antibacterial and antitumor drugs	90
	Mesoporous silica nanoparticles coated with ϵ -PLL and loaded with itraconazole	Synergistic properties between itraconazole and ϵ -PLL Increased solubility of the drug	91
	ϵ -PLL-modified poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles loaded with ovalbumin	Increased stability of the nanoparticles Enhanced lymphocyte proliferation and cytokine production	93
	Poly(ethylene glycol) maleimide and ϵ -PLL modified with mercaptopropionic acid nanoparticles, with encapsulation of doxorubicin or lapatinib	pH-dependent release properties, antitumor properties	50
	Poly(ethylene glycol) and poly(vinyl alcohol) nanoparticles functionalized with ϵ -PLL and loaded with insulin	Increased bioavailability and absorption of insulin in the lung	95
	Bovine serum albumin nanoparticles coated with ϵ -PLL and loaded with epigallocatechin gallate	Anticancer properties	96
	Succinylated β -lactoglobulin and bovine β -lactoglobulin crosslinked with ϵ -PLL nanoparticles loaded with curcumin	Decreased inflammatory cytokine secretion	97
Cyclodextrin nanoassemblies	Cyclodextrins conjugated with ϵ -PLL and loaded with plasmid DNA	Gene therapy applications	100
	Glycine- β -cyclodextrin functionalized with ϵ -PLL and loaded with scullarin	Improved stability of scullarin	98
	Polyelectrolyte complexes based on β -cyclodextrin sulfate and ϵ -PLL and loaded with various proteins (lysozyme, lactoferrin, actinidin, and albumin)	Improved intestinal absorption of proteins	102
Micro- and nanocomplexes	Folic acid and ϵ -PLL microcapsules loaded with coumarin-6	Release of hydrophobic drugs for cancer therapy	104
	Iron oxide nanoparticles functionalized with branched ϵ -PLL and loaded with vascular endothelial growth factor	Improved dispersion of the nanoparticles	106
	Carbonated hydroxyapatite and agarose nanocomposite loaded with ϵ -PLL	Osteoconductive and antibacterial properties	1
Nanofibers	Poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid) functionalized with ϵ -PLL	Antibacterial properties, biocompatibility, antitumor activity	77
	Poly(ϵ -carbolactone), poly(vinyl alcohol), tea polyphenols, and ϵ -PLL	Antioxidant and antibacterial properties	78
	Gelatin, polydopamine, and ϵ -PLL	Wound healing and antibacterial properties	79
Coatings	Fish gelatin and chitosan crosslinked with glutaraldehyde or cinnamaldehyde films loaded with ϵ -PLL	Antibacterial properties	47
	Starch- ϵ -PLL composite films loaded with ϵ -PLL	Antibacterial properties	85
	Hyperbranched ϵ -PLL covalently immobilized with 3-glycidyloxypropyltrimethoxysilane on titanium surface	Antibacterial and osseointegration properties	111
	ϵ -PLL and gum Arabic layer by layer on polydopamine-coated titanium dioxide nanotubes	Biocompatibility and antibacterial properties	112
	Polyethyleneimine, furan functionalized-poly(acrylic acid), and thiol functionalized- ϵ -PLL film	Self-healing and antibacterial properties	49
	Graphene oxide and ϵ -PLL coating of cobalt-chromium-molybdenum alloys	Antibacterial properties via contact-killing mechanism, anti-adhesive properties	113
	ϵ -PLL with 1,4-bis(2-ethylexyl) sodium sulfosuccinate surfactant coating of polyurethane surface	Inhibited inflammatory response, antibacterial and antifouling properties	43
	Polycaprolactone and hydroxyapatite scaffolds coated with ϵ -PLL	Improved biocompatibility and osteoconductivity, antibacterial properties, decreased pro-inflammatory cytokine secretion	115
	Catechol-modified ϵ -PLL and dopamine hydrochloride modified with sodium hyaluronate layer by layer	Strong adhesion properties and biocompatibility	117
	Cellulose membrane functionalized with ϵ -PLL	Antibacterial properties and biocompatibility	118

Hydrogels	Carboxymethyl cellulose fibers crosslinked with epichlorohydrin and functionalized with ϵ -PLL	Antibacterial, anti-inflammatory, and osseointegration properties	119
	Chitosan and β -glycerophosphate hydrogels loaded with ϵ -PLL	Decreased biofilm thickness	83
	Quaternized chitosan, benzaldehyde-terminated 4-armed PEG, and ϵ -PLL-grafted graphene quantum dots	Antibacterial properties via photo-thermal therapy, self-healing properties, and biocompatibility	84
	Aldehyded dextran and ϵ -PLL hydrogel	Antibacterial properties, biocompatibility	128
	Aldehyded dextran and ϵ -PLL hydrogel loaded with vancomycin	Antibacterial properties	129
	Aldehyded dextran and ϵ -PLL hydrogel loaded with fibroblast growth factor	Wound healing promotion, antimicrobial properties, improved endothelial cell migration	131
	Aldehyded dextran and ϵ -PLL carbon dots hydrogel	Antibacterial properties	132
	ϵ -PLL modified with carboxylated poly(vinyl alcohol) and oxidized dextran hydrogel loaded with silver nanoparticles	Antibacterial and wound healing properties	133
	Pullulan, branched polyethyleneimine, and ϵ -PLL hydrogels loaded with doxorubicin and cisplatin	Biocompatibility, anticancer properties	135
	Aldehyded poly(ethylene glycol) and ϵ -PLL hydrogels loaded with arginine-glycine-aspartic acid peptide	Improved cell adhesion	136
	Catechol and ϵ -PLL hydrogels	Antibacterial and antibiofilm properties	140
	Polydopamine and ϵ -PLL hydrogel	Antibacterial, antibiofilm, and wound healing properties, increased secretion of vascular endothelial growth factor, reduced pro-inflammatory cytokine secretion	141
	Agarose, polydopamine, and ϵ -PLL hydrogel	Photothermal functionality, anti-inflammatory and antibacterial properties	142
	Hyaluronic acid functionalized with dopamine and catechol modified- ϵ -PLL hydrogel loaded with Fe^{3+} ions	Adhesive properties	143
	Poly(ethylene glycol) and ϵ -PLL hydrogel	Wound healing and adhesion strength properties, biocompatibility	144
	Hydroxybutyl chitosan and ϵ -PLL hydrogel loaded with bone marrow mesenchymal stem cells	Wet adhesion strength properties, thermos-sensitive properties, improved fibroblast migration and growth factor secretion	145
	ϵ -PLL crosslinked with octanedioic acid hydrogel functionalized with a cell binding peptide	Antibacterial properties, improved cell adhesion and proliferation, amoebicidal activity	148
	Carboxymethyl chitosan and ϵ -PLL hydrogel	Injectable materials, self-degradation and bacteriostatic properties	153
	Quaternized chitosan, ϵ -PLL, and tannic acid hydrogel	Stability, biocompatibility, hemostatic properties	154
	Thiol-chitosan and maleimide- ϵ -PLL hydrogel	Adhesion properties, biocompatibility	155
	Poly(ethylene glycol) functionalized with p-nitrophenylchloroformate, ϵ -PLL, and tyramine hydrogel crosslinked with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide	Fast gelation properties, biocompatibility	157
	ϵ -PLL and hydroxyphenylpropionic acid hydrogel crosslinked with horseradish and hydrogen peroxide	Biocompatibility, antibacterial and adhesive properties	42
	Gelatin, ϵ -PLL, and cucurbit[7]uril hydrogel crosslinked with transglutaminase	Antibacterial and hemorheological properties, biocompatibility	158
	ϵ -PLL and gellan gum hydrogel	Biocompatibility	159
	Hyaluronic acid and ϵ -PLL hydrogel	Antibacterial properties	161
	Oxidized- ϵ -PLL, 1-vinyl-2-pyrrolidinone, and <i>N</i> -methylol acrylamide dual network hydrogels	Antibacterial, wound healing, self-healing properties	162
	ϵ -PLL functionalized with methacrylic acid and tannic acid dual network hydrogel	Antibacterial properties	163
	ϵ -PLL grafted to poly(ethylene glycol), poly(DVBAPS-co-GMA) and glycidyl-trimethylammonium chloride hydrogel	Antibacterial properties, enhanced cell proliferation and adhesion	164
	Poly(ethylene glycol) diacrylate, ϵ -PLL methacrylic acid, <i>N,N</i> -dimethyl acrylamide and Irgacure 2959 hydrogel	Antimicrobial properties and biocompatibility	165

1.3. Les hydrogels, biomatériaux prometteurs

Comme il a été indiqué précédemment, les AMPs sont des peptides très prometteurs dans le développement de biomatériaux, permettant de lutter contre les risques d'infection tout en limitant les phénomènes d'antibiorésistance ¹⁶⁶. Afin de disposer d'un système d'administration local, ils peuvent être chargés notamment dans des hydrogels, ce que nous allons décrire dans cette partie.

1.3.1. Informations générales sur les hydrogels

Les hydrogels sont des matériaux constitués d'un réseau 3D, plus ou moins réticulé, capables de retenir une grande quantité d'eau. Ce réseau 3D est le plus souvent constitué de polymères, naturels ou synthétiques, mais également de peptides et de polymères ¹⁶⁷. Le chitosane, l'acide hyaluronique, la gélatine mais aussi le poly(éthylène glycol) (PEG) sont très utilisés puisque ce sont des polymères possédant un caractère hydrophile, qui permettent la formulation de gels hydratés. Ils sont également stables (voir réticulation ci-dessous) et biocompatibles, et peuvent être facilement fonctionnalisés.

Afin d'obtenir le réseau 3D, ces polymères et peptides doivent être réticulés de manière physique ou chimique. La réticulation physique repose sur la formation de liaisons faibles, telles que les liaisons hydrogènes, les liaisons de van der Waals, ou encore par des interactions entre des ions. Par exemple, Yu *et al.* ont développé des hydrogels réticulés physiquement grâce à la chélation entre des sels et des groupements biphosphate ¹⁶⁸. Les hydrogels réticulés physiquement sont la plupart du temps facilement dégradables dans le milieu et possèdent une gélification réversible, ce qui permet de passer facilement de l'état de gel à l'état de solution.

Contrairement aux hydrogels réticulés physiquement, les hydrogels réticulés chimiquement possèdent un réseau 3D réticulé grâce à la formation de liaisons covalentes. Les hydrogels obtenus sont beaucoup plus stables que les hydrogels réticulés physiquement. Différents types de réactions permettent la formation de ces hydrogels ¹⁶⁹. La première méthode consiste à ajouter un photoinitiateur afin d'initier une polymérisation radicalaire. Les hydrogels formés par cette méthode sont très stables dans le temps ¹⁷⁰. Cependant, les photoinitiateurs et la formation de radicaux libres lors de la réaction peuvent se révéler toxiques pour les cellules. La deuxième méthode consiste à utiliser des polymères fonctionnalisés pour former le réseau. Des réactions entre les fonctions greffées sur les chaînes permettent de former le réseau 3D. Parmi les réactions les plus étudiées, on trouve la formation de bases de Schiff lors de la condensation d'une amine primaire avec une cétone ou un aldéhyde, ou encore des additions de Michael sous catalyse basique (réaction entre un nucléophile et un alcène) ^{171, 172}. Les thiols

et les maléimides sont également des fonctions très réactives qui peuvent être facilement greffées sur des polymères comme le PEG et ainsi permettre la formation de liaisons covalentes par réaction de Michael ¹⁷³.

Ainsi, un grand nombre d'hydrogels différents peuvent être formés. Leurs propriétés mécaniques sont modulables et dépendent directement des molécules utilisées pour la construction du réseau 3D, de leur concentration, mais également de la manière dont va être réticulé l'hydrogel. Cette diversité d'hydrogels permet d'obtenir des matériaux avec des propriétés intéressantes pour de nombreuses applications dans le domaine biomédical, notamment pour la libération de molécules d'intérêt, mais également pour la cicatrisation des plaies et des tissus par des processus de déterision ¹⁷⁴⁻¹⁷⁶.

1.3.2. Hydrogels antimicrobiens pour des applications de cicatrisation tissulaire

Comme expliqué précédemment, les hydrogels peuvent être utilisés dans de nombreux domaines. Dans cette partie nous nous concentrerons sur les hydrogels permettant de diminuer le risque d'infection et favorisant une meilleure cicatrisation tissulaire. En effet, il est possible de développer des hydrogels possédant des propriétés d'adhésion et des propriétés mécaniques proches de celles des tissus pour améliorer la cicatrisation ¹⁷⁷. En plus de leurs propriétés mécaniques, la capacité des hydrogels à retenir une grande quantité d'eau en fait de très bons candidats pour des applications de cicatrisation tissulaire et permettent d'améliorer la réparation des tissus grâce à une bonne intégration du matériau et à l'hydratation des tissus. On retrouve donc un grand nombre d'études qui ont pour but de développer des hydrogels qui vont à la fois délivrer une action antimicrobienne et aider à la cicatrisation tissulaire ^{178, 179}.

Un grand nombre d'hydrogels possédant des propriétés antimicrobiennes intrinsèques sont décrits dans la littérature. Cela signifie qu'il n'est pas utile de rajouter des antibiotiques ou d'autres molécules antimicrobiennes dans le réseau de l'hydrogel pour lui conférer une activité. Par exemple, Sun *et al.* ont développé des hydrogels injectables et réticulés chimiquement par photopolymérisation ¹⁸⁰. Ces hydrogels ont été synthétisés à base de plusieurs polymères synthétiques modifiés. La ϵ -PLL est modifiée avec du méthacrylate de glycidyl pour permettre la formation du réseau 3D avec l'acide γ -poly(glutamique). Les résultats présentés dans cette étude démontrent que ces hydrogels permettent d'inhiber l'infection bactérienne par le *Staphylococcus aureus* mais également qu'ils promeuvent la cicatrisation tissulaire. Une autre étude par Zhou *et al.* présente un hydrogel réticulé physiquement par l'auto assemblage d'un AMP provenant de la gelée royale des abeilles, la jelleine-1 dans du tampon phosphate salin (PBS) ¹⁸¹. L'hydrogel ainsi synthétisé présente des

propriétés antibactériennes vis-à-vis de la bactérie à Gram positif *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, mais également des propriétés pro-cicatrisantes grâce à la dégradation contrôlée du matériau, sans ajout de molécules d'intérêt dans le réseau 3D.

Cependant, tous les hydrogels ne présentent pas des propriétés antimicrobiennes et cicatrisantes intrinsèques. Ainsi, une fois le réseau 3D construit, il est possible de charger des molécules actives en son sein ; c'est la raison pour laquelle les hydrogels sont largement étudiés en tant que plateforme de « drug delivery » (libération de médicaments). Il est possible de charger un grand nombre de molécules différentes, comme des antibiotiques, des médicaments anticancéreux ou anti-inflammatoires, ou bien encore des peptides, en vue de les libérer localement, au plus proche de la cible thérapeutique ¹⁸²⁻¹⁸⁵.

L'ajout de molécules antimicrobiennes dans un hydrogel puis leur libération permet notamment d'améliorer leur activité. En effet, l'action est ciblée près de l'infection. Ajouter la molécule d'intérêt dans un hydrogel permet de diminuer la quantité nécessaire de molécules à administrer pour inhiber la croissance des microorganismes grâce à une meilleure disponibilité de la molécule (en augmentant sa solubilité, en la protégeant de l'environnement extérieur ce qui permet de limiter sa dégradation dans le milieu extérieur), mais aussi grâce à une dose locale qui sera plus importante que lors d'une administration par voie systémique ¹⁸⁶.

Cependant, il reste difficile de contrôler la vitesse de libération des AMPs chargés dans un hydrogel car ce paramètre est directement lié à la vitesse de dégradation du matériau ou bien à l'affinité des AMPs avec le réseau 3D et avec l'environnement extérieur de l'hydrogel. Ainsi, une autre méthode doit être trouvée afin de contrôler de manière plus précise la libération des molécules d'intérêt et ainsi améliorer la délivrance de l'activité au sein d'une infection.

1.3.3. Les hydrogels « intelligents »

De plus en plus d'études sur le développement d'hydrogels dits « intelligents », c'est-à-dire des hydrogels où la libération des molécules d'intérêt est contrôlée par un stimulus physiologique, tel que le pH, la température, ou encore la sécrétion d'enzymes dans le milieu, sont effectuées. Ces études ont pour but de mieux contrôler la libération de molécules actives et ainsi d'améliorer le système sur un plus long terme.

Lorsqu'une infection se déclare, les paramètres physiologiques cités précédemment (pH, température, enzymes présentes dans le milieu) sont modifiés. Une diminution de pH ou une augmentation de température sont observées dans la région de l'infection. Ainsi, de nombreux chercheurs tentent de concevoir des matériaux qui réagissent à ces changements physiologiques pour initier la libération de molécules uniquement lorsque l'infection se déclare.

C'est dans ce cadre que des hydrogels développés à partir de polymères possédant une « lower critical solution temperature » (LCST) proche de la température physiologique, c'est-à-dire des polymères qui changent de configuration lorsque la température devient supérieure à cette LCST, ont été étudiés. Lorsqu'une infection se déclare, la température du corps augmente en raison de la production de cytokines et de cellules de l'immunité. Si la température augmente au-delà de 38°C localement, elle engendre un changement structural de l'hydrogel qui lui-même induit la libération de composés antimicrobiens dans le milieu ^{187, 188}. Grâce à cette méthode, la quantité de médicaments à administrer peut-être diminuée car la libération se fait localement et uniquement lorsque l'infection se déclare. Cela permet donc d'éviter d'administrer des médicaments à titre préventif, mais aussi d'assurer leur activité sur un plus long terme.

Une autre technologie d'hydrogel se basant sur la formation de bases de Schiff est également très étudiée ^{189, 190}. Ces matériaux sont stables à pH physiologique mais se dégradent rapidement lorsque le pH diminue. Il est donc possible de contrôler la vitesse de dégradation du matériau par ce changement de pH. En effet, en présence d'une infection, le milieu s'acidifie par la présence de bactéries et provoque le clivage de la base de Schiff. La dégradation du biomatériau qui s'ensuit permet la libération des molécules antibactériennes dans le milieu et la mort des bactéries présentes à proximité du matériau. Ces bases de Schiff peuvent être formés à partir d'AMPs, ce qui permet d'obtenir la libération de molécules biocompatibles. C'est le cas des hydrogels présentés par Suo *et al* ¹⁹¹. Ces derniers ont utilisé de l'acide hyaluronique afin de former une base de Schiff avec un AMP (constitué principalement de lysines). Lorsque le pH s'acidifie au début d'une infection, la libération de l'AMP due au clivage de la base de Schiff permet de conférer au milieu les propriétés antimicrobiennes de l'AMP et ainsi de combattre les microorganismes visés par l'AMP chargé dans le gel.

Il existe également des études qui présentent des hydrogels répondant à des stimuli engendrés par la présence d'enzymes sécrétées par des bactéries ^{192, 193}. Ces enzymes permettent de cliver certaines liaisons peptidiques et sont nécessaires à la vie cellulaire. Elles ont également différentes fonctions telles que la digestion et la respiration de la bactérie, etc.

Il est donc possible d'imaginer un système, comme celui décrit par Wang *et al.*, où des composés actifs, ici une molécule anticancéreuse, sont libérés dans le milieu grâce au clivage d'une liaison par une enzyme sécrétée par une bactérie naturellement présente dans l'estomac ¹⁹³. Cet hydrogel est chargé avec une molécule utilisée pour traiter les cancers du côlon, l'imatinib. Une enzyme présente dans l'intestin permet de dégrader l'hydrogel en nanogel et ainsi améliore l'action de la molécule anticancéreuse grâce à sa libération et à son accumulation locale dans le milieu.

Une autre étude de Zhou *et al.* présente également des hydrogels répondant à la présence d'enzymes dans le milieu ¹⁹⁴. Ces hydrogels sont développés à partir de gélatine méthacrylate réticulée par UV. Sous l'action des enzymes ou des toxines produites par des bactéries, telles que de l' α -hémolysine ou des phospholipases, les hydrogels libèrent les molécules antimicrobiennes qu'ils contiennent. Ce système permet notamment d'avoir une action prolongée dans le temps puisque les molécules actives ne sont libérées que lorsqu'une bactérie pathogène arrive à proximité du matériau.

Ainsi, le développement d'hydrogels « intelligents » répondant à un stimulus produit par une bactérie semble très prometteur afin de contrer les infections mais restent compliqués à développer et très peu d'articles sur le sujet paraissent dans la littérature.

1.4. Conclusion et perspectives

Pour conclure, les hydrogels semblent être de bons candidats en tant que biomatériaux pour limiter les infections nosocomiales. Ils peuvent être facilement chargés avec différentes molécules et ont un large champ d'applications possibles. Parmi les molécules qu'il est possible de charger dans les hydrogels, les peptides sont intéressants car un grand nombre d'entre eux possèdent des propriétés antimicrobiennes. Ce sont des molécules relativement petites, possédant des fonctions réactives qui permettent leur chargement facile dans les hydrogels. De plus, le large champ d'action antimicrobienne et antifongique des peptides ainsi que la possibilité de les fonctionnaliser aisément en font des candidats idéaux pour diminuer les risques d'infections liés notamment aux dispositifs médicaux. Enfin, de plus en plus d'études se basent sur les changements physiques et chimiques du milieu lors d'une infection afin de déclencher et de contrôler la libération des molécules actives. Les bactéries sécrètent également un grand nombre de molécules, notamment des enzymes, lorsqu'elles se développent. Ainsi, il peut être intéressant d'utiliser la présence de ces enzymes pour concevoir des hydrogels capables de libérer des peptides antimicrobiens uniquement lorsqu'une infection a lieu près du biomatériau. Ces systèmes auront également l'avantage de d'être spécifiques d'une bactérie pathogène et de ne pas détruire d'autres bactéries nécessaires au bon fonctionnement du corps humain, comme celles du microbiote. Cependant, il est nécessaire de s'assurer que la quantité d'enzymes sécrétées est suffisante pour libérer assez de peptides dans le milieu et permettre une activité antimicrobienne significative. Ainsi, il reste beaucoup de chemin à parcourir avant de trouver un système idéal qui permettrait de cibler les différents microorganismes souhaités mais également de contrôler la libération des molécules actives.

Bibliographie

1. Z. He, X. Zhou, Y. Wang, J. Lin, S. Huang, R. Hu, Y. Zhou, Q. Qian and H. Deng, *Carbohydr. Polym.*, 2021, **273**, 118525.
2. P. Bastos, F. Trindade, J. da Costa, R. Ferreira and R. Vitorino, *Med Res Rev*, 2018, **38**, 101-146.
3. J. Y. Niu, I. X. Yin, W. K. K. Wu, Q. L. Li, M. L. Mei and C. H. Chu, *Arch. Oral Biol.*, 2021, **122**, 105022.
4. A. Bhunia, A. Ramamoorthy and S. Bhattacharjya, *Chemistry*, 2009, **15**, 2036-2040.
5. D. E. Fry, *Surg Infect (Larchmt)*, 2018, **19**, 804-811.
6. K. Browne, S. Chakraborty, R. Chen, M. D. Willcox, D. S. Black, W. R. Walsh and N. Kumar, *Int J Mol Sci*, 2020, **21**.
7. X. Li, S. Zuo, B. Wang, K. Zhang and Y. Wang, *Molecules*, 2022, **27**.
8. J. Y. Niu, I. X. Yin, M. L. Mei, W. K. K. Wu, Q. L. Li and C. H. Chu, *Mol. Oral Microbiol.*, 2021, **36**, 159-171.
9. Y. Luo and Y. Song, *Int J Mol Sci*, 2021, **22**.
10. P. G. Lima, J. T. A. Oliveira, J. L. Amaral, C. D. T. Freitas and P. F. N. Souza, *Life Sci*, 2021, **278**, 119647.
11. B. Thankappan, J. Sivakumar, S. Asokan, M. Ramasamy, M. M. Pillai, R. Selvakumar and J. Angayarkanni, *Eur J Pharm Sci*, 2021, **161**, 105784.
12. A. Zaet, P. Darteville, F. Daouad, C. Ehlinger, F. Quiles, G. Francius, C. Boehler, C. Bergthold, B. Frisch, G. Prevost, P. Lavalle, F. Schneider, Y. Haikel, M. H. Metz-Boutigue and C. Marban, *Sci Rep*, 2017, **7**, 15199.
13. B. H. Gan, J. Gaynord, S. M. Rowe, T. Deingruber and D. R. Spring, *Chem Soc Rev*, 2021, **50**, 7820-7880.
14. M. D. T. Torres, A. F. Silva, G. P. Andrade, C. N. Pedron, G. Cerchiaro, A. O. Ribeiro, V. X. Oliveira, Jr. and C. de la Fuente-Nunez, *Bioeng Transl Med*, 2020, **5**, e10167.
15. V. Lazar, A. Martins, R. Spohn, L. Daruka, G. Grezal, G. Fekete, M. Szamel, P. K. Jangir, B. Kintses, B. Csorgo, A. Nyerges, A. Gyorkei, A. Kincses, A. Der, F. R. Walter, M. A. Deli, E. Urban, Z. Hegedus, G. Olajos, O. Mehi, B. Balint, I. Nagy, T. A. Martinek, B. Papp and C. Pal, *Nat Microbiol*, 2018, **3**, 718-731.
16. P. K. Jangir, L. Ogunlana and R. C. MacLean, *Trends Microbiol.*, 2021, **29**, 1058-1061.
17. Y. Zhu, W. Hao, X. Wang, J. Ouyang, X. Deng, H. Yu and Y. Wang, *Med Res Rev*, 2022, **42**, 1377-1422.
18. A. Lewies, L. H. Du Plessis and J. F. Wentzel, *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 2019, **11**, 370-381.

19. M. Xiao, J. Jasensky, J. Gerszberg, J. Chen, J. Tian, T. Lin, T. Lu, J. Lahann and Z. Chen, *Langmuir*, 2018, **34**, 12889-12896.
20. F. Costa, S. Maia, J. Gomes, P. Gomes and M. C. Martins, *Acta Biomater*, 2014, **10**, 3513-3521.
21. M. Nicolas, B. Beito, M. Oliveira, M. T. Martins, B. Gallas, M. Salmain, S. Boujday and V. Humblot, *Antibiotics*, 2022, **11**.
22. N. Boncukcu, B. Akgul, I. Akmayan, H. Berber, E. S. Abamor, T. Ozbek and S. Derman, *Biotechnol Prog*, 2022, DOI: 10.1002/btpr.3314, e3314.
23. H. Chen, Y. Song, Y. Peng, M. Wang, W. Dessie, G. J. Duns, L. Xu, X. Luo and Z. Qin, *Macromol Biosci*, 2023, DOI: 10.1002/mabi.202200514, e2200514.
24. T. Verma, A. Aggarwal, S. Singh, S. Sharma and S. J. Sarma, *Journal of Molecular Structure*, 2022, **1248**, 131380.
25. C. Moore, C. Dolecek, Antimicrobial Resistance, *Lancet*, 2022, **399**, 629-655.
26. Y. Yan, Y. Li, Z. Zhang, X. Wang, Y. Niu, S. Zhang, W. Xu and C. Ren, *Colloids Surf., B* 2021, **202**, 111682.
27. M. Zheng, M. Pan, W. Zhang, H. Lin, S. Wu, C. Lu, S. Tang, D. Liu and J. Cai, *Bioact. Mater.*, 2021, **6**, 1878-1909.
28. S. Shima and H. Sakai, *Agric. Biol. Chem.*, 1977, **41**, 1807-1809.
29. T. Yoshida and T. Nagasawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, **62**, 21-26.
30. X.-S. Chen, K.-F. Wang, G.-C. Zheng, Y. Gao and Z.-G. Mao, *Process Biochem.*, 2018, **68**, 22-29.
31. S. Zhang, H. Chen, Z. Shi, Y. Liu, L. Liu, J. Yu and Y. Fan, *Industrial Crops and Products*, 2023, **194**, 116288.
32. C. Shu, K. Cui, Q. Li, J. Cao and W. Jiang, *Int J Food Microbiol*, 2021, **348**, 109224.
33. S. C. Shukla, A. Singh, A. K. Pandey and A. Mishra, *Biochemical Engineering Journal*, 2012, **65**, 70-81.
34. K. Yamanaka, N. Kito, Y. Imokawa, C. Maruyama, T. Utagawa and Y. Hamano, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, **76**, 5669-5675.
35. S. Chen, S. Huang, Y. Li and C. Zhou, *Front. Chem.*, 2021, **9**, 659304.
36. C. H. Ho, E. Odermatt, I. Berndt and J. C. Tiller, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2008, **46**, 5053-5063.
37. K. Kim, K. Ryu, Y. S. Choi, Y. Y. Cho, J. Y. Lee, H. S. Lee and H. Chang Kang, *Biomacromolecules*, 2018, **19**, 2483-2495.
38. A. K. Pandey and A. Kumar, *Process Biochem.*, 2014, **49**, 496-505.
39. Z. Lv, Y. Lu, B. Li, L. Shi, K. Zhang and B. Ge, *Microorganisms*, 2022, **10**.
40. I. L. Shih, M. H. Shen and Y. T. Van, *Bioresour. Technol.*, 2006, **97**, 1148-1159.

41. S. Li, Y. Mao, L. Zhang, M. Wang, J. Meng, X. Liu, Y. Bai and Y. Guo, *Biotechnol. Biofuels Bioprod.*, 2022, **15**, 65.
42. R. Wang, D.-l. Xu, L. Liang, T.-t. Xu, W. Liu, P.-k. Ouyang, B. Chi and H. Xu, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 8620-8627.
43. H. Yu, L. Liu, X. Li, R. Zhou, S. Yan, C. Li, S. Luan, J. Yin and H. Shi, *Chem. Eng. J.*, 2019, **360**, 1030-1041.
44. R. Lace, G. L. Duffy, A. G. Gallagher, K. G. Doherty, O. Maklad, D. A. Wellings and R. L. Williams, *Macromol. Biosci.*, 2021, **21**, e2100036.
45. M. T. Chevalier, M. C. Garcia, D. Gonzalez, S. M. Gomes-Filho, D. S. Basseres, H. Farina and V. A. Alvarez, *J. Microencapsul.*, 2017, **34**, 582-591.
46. T. Niaz, A. Ihsan, R. Abbasi, S. Shabbir, T. Noor and M. Imran, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, **138**, 1006-1018.
47. Z. Mousavi, M. Naseri, S. Babaei, S. M. H. Hosseini and S. S. Shekarforoush, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2021, **183**, 1743-1752.
48. C. Li, Q. Zhang, D. Lan, M. Cai, Z. Liu, F. Dai and L. Cheng, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2022, **220**, 1049-1059.
49. C. Zhou, J. Zhou, X. Ma, D. Pranantyo, J. Li, L. Xu and V. X. Truong, *Mater. Sci. Eng., C*, 2021, **121**, 111828.
50. Z. Guo, J. Sui, M. Ma, J. Hu, Y. Sun, L. Yang, Y. Fan and X. Zhang, *J. Controlled Release*, 2020, **326**, 350-364.
51. H. Wu, S. Hu, C. Nie, J. Zhang, H. Tian, W. Hu, T. Shen and J. Wang, *Carbohydr. Polym.*, 2021, **255**, 117337.
52. L. Cai, S. Liu, J. Guo and Y. G. Jia, *Acta Biomater.*, 2020, **113**, 84-100.
53. N. A. Patil and B. Kandasubramanian, *Eur. Polym. J.*, 2021, **146**, 110248.
54. W. Jiao, X. Liu, Q. Chen, Y. Du, Y. Li, F. Yue, X. Dong and M. Fu, *Postharvest Biol. Technol.*, 2020, **168**, 111270.
55. H. Liu, J. Chen, Z. Xia, M. An and Y. Wu, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2020, **163**, 147-153.
56. M. S. Rishpana and J. S. Kabbin, *J. Clin. Diagn. Res.*, 2015, **9**, 11-13.
57. A. M. El-Ganiny, N. E. Yossef and H. A. Kamel, *Curr. Med. Mycol.*, 2021, **7**, 31-37.
58. C.D.C. Prevention, Invasive Candidiasis Statistics, <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/invasive/statistics.html>, accessed : April 2023).
59. R.-S. Ye, Z.-H. Zhang, H.-Y. Xu, F. Xu, Z. P. Aguilar, Y.-H. Xiong, Z.-L. Zeng and H. Wei, *Biotechnol. Lett.*, 2013, **35**, 2147-2153.
60. F. Padilla-Garfias, L. Rios-Cifuentes, N. S. Sanchez, M. Calahorra and A. Pena, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, 2022, **1866**, 130197.

61. M. Wei, Y. Ge, C. Li, Y. Chen, W. Wang, B. Duan and X. Li, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2018, **103**, 23-27.
62. M. Hyldgaard, T. Mygind, B. S. Vad, M. Stenvang, D. E. Otzen and R. L. Meyer, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2014, **80**, 7758-7770.
63. B. Rodrigues, T. P. Morais, P. A. Zaini, C. S. Campos, H. O. Almeida-Souza, A. M. Dandekar, R. Nascimento and L. R. Goulart, *Sci. Rep.*, 2020, **10**, 11324.
64. Z. Tan, Y. Shi, B. Xing, Y. Hou, J. Cui and S. Jia, *Bioresources and Bioprocessing*, 2019, **6**.
65. J. N. Liu, S. L. Chang, P. W. Xu, M. H. Tan, B. Zhao, X. D. Wang and Q. S. Zhao, *J. Agric. Food Chem.*, 2020, **68**, 1101-1109.
66. C. Shu, K. Cui, Q. Li, J. Cao and W. Jiang, *Int. J. Food Microbiol.*, 2021, **348**, 109224.
67. W. Jiao, X. Liu, Q. Chen, Y. Du, Y. Li, F. Yue, X. Dong and M. Fu, *Postharvest Biology and Technology*, 2020, **168**, 111270.
68. L. Lin, Y. Gu, C. Li, S. Vittayapadung and H. Cui, *Food Control*, 2018, **91**, 76-84.
69. T. Bo, P.-P. Han, Q.-Z. Su, P. Fu, F.-Z. Guo, Z.-X. Zheng, Z.-L. Tan, C. Zhong and S.-R. Jia, *Food Control.*, 2016, **61**, 123-134.
70. L. Jia, P. Zhang, H. Sun, Y. Dai, S. Liang, X. Bai and L. Feng, *Nanomaterials (Basel)*, 2021, **11**.
71. R. Mittal, A. P. Patel, V. M. Jhaveri, S. S. Kay, L. H. Debs, J. M. Parrish, D. R. Pan, D. Nguyen, J. Mittal and R. D. Jayant, *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2018, **15**, 301-318.
72. M. T. Ways, K. W. Ng, W. M. Lau and V. V. Khutoryanskiy, *Pharmaceutics*, 2020, **12**.
73. W. Li, W. Li, Y. Wan, L. Wang and T. Zhou, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2022, **204**, 652-660.
74. T. Xu, B. Chi, M. Chu, Q. Zhang, S. Zhan, R. Shi, H. Xu and C. Mao, *Biosens. Bioelectron.*, 2018, **99**, 571-577.
75. S. Chen, B. Liu, M. A. Carlson, A. F. Gombart, D. A. Reilly and J. Xie, *Nanomedicine (Lond.)*, 2017, **12**, 1335-1352.
76. A. J. Hassiba, M. E. Em Zowalatu, G. K. Nasrallah, T. J. Webster, A. S. Luyt, A. M. Abdullah and A. Elzatahry, *Nanomedicine (Lond.)*, 2015, DOI: 10.2217/nnm.15.211.
77. G. Amariei, V. Kokol, V. Vivod, K. Boltes, P. Leton and R. Rosal, *Int. J. Pharm.*, 2018, **553**, 141-148.
78. X. Lan, Y. Liu, Y. Wang, F. Tian, X. Miao, H. Wang and Y. Tang, *Int. J. Pharm.*, 2021, **601**, 120525.
79. V. Mayandi, A. C. Wen Choong, C. Dhand, F. P. Lim, T. T. Aung, H. Sriram, N. Dwivedi, M. H. Periyah, S. Sridhar, M. Fazil, E. T. L. Goh, G. Orive, W. B. R, T. M. S. Barkham, X. J. Loh, Z. X. Liang, V. A. Barathi, S. Ramakrishna, S. J. Chong, N. K. Verma and R. Lakshminarayanan, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2020, **12**, 15989-16005.

80. Q. Yang, S. Cui, X. Song, J. Hu, Y. Zhou and Y. Liu, *Mater. Sci. Eng., C* 2021, **119**, 111608.
81. Y. Yang, L. Xu, J. Wang, Q. Meng, S. Zhong, Y. Gao and X. Cui, *Carbohydr. Polym.*, 2022, **283**, 119161.
82. H. Liu, C. Wang, C. Li, Y. Qin, Z. Wang, F. Yang, Z. Li and J. Wang, *RSC Adv*, 2018, **8**, 7533-7549.
83. B. A. Pati, W. E. Kurata, T. S. Horseman and L. M. Pierce, *Wound Repair Regen.*, 2021, **29**, 316-326.
84. C. Cheng, H. Zhong, Y. Zhang, X. Gao, J. Wang, J. Liu and X. Han, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2022, **210**, 377-393.
85. L. Zhang, R. Li, F. Dong, A. Tian, Z. Li and Y. Dai, *Food Chem.*, 2015, **166**, 107-114.
86. M. Awad, M. Yosri, M. M. Abdel-Aziz, A. M. Younis and N. M. Sidkey, *Biol. Trace. Elem. Res.*, 2021, **199**, 4225-4236.
87. A. Kaur, S. Preet, V. Kumar, R. Kumar and R. Kumar, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2019, **176**, 62-69.
88. N. Mas, I. Galiana, L. Mondragon, E. Aznar, E. Climent, N. Cabedo, F. Sancenon, J. R. Murguia, R. Martinez-Manez, M. D. Marcos and P. Amoros, *Chemistry*, 2013, **19**, 11167-11171.
89. L. Mondragon, N. Mas, V. Ferragud, C. de la Torre, A. Agostini, R. Martinez-Manez, F. Sancenon, P. Amoros, E. Perez-Paya and M. Orzaez, *Chemistry*, 2014, **20**, 5271-5281.
90. L. Polo, N. Gomez-Cerezo, E. Aznar, J. L. Vivancos, F. Sancenon, D. Arcos, M. Vallet-Regi and R. Martinez-Manez, *Acta Biomater.*, 2017, **50**, 114-126.
91. Y. Song, P. Zhu, Y. Wu, L. Tan, W. Wei, S. Liu, Q. Huang and J. Chen, *Mater. Sci. Eng., C*, 2019, **99**, 231-240.
92. N. Velikova, N. Mas, L. Miguel-Romero, L. Polo, E. Stolte, E. Zaccaria, R. Cao, N. Taverne, J. R. Murguia, R. Martinez-Manez, A. Marina and J. Wells, *Nanomedicine*, 2017, **13**, 569-581.
93. A. Wusiman, P. Gu, Z. Liu, S. Xu, Y. Zhang, Y. Hu, J. Liu, D. Wang and X. Huang, *Int. J. Nanomedicine*, 2019, **14**, 3221-3234.
94. G. Liu, Y. Li, L. Yang, Y. Wei, X. Wang, Z. Wang and L. Tao, *RSC Advances*, 2017, **7**, 18252-18259.
95. K. Shi, Y. Liu, L. Ke, Y. Fang, R. Yang and F. Cui, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2015, **72**, 1441-1450.
96. Z. Li, J. Ha, T. Zou and L. Gu, *Food Funct.*, 2014, **5**, 1278-1285.
97. N. Pujara, R. Giri, K. Y. Wong, Z. Qu, P. Rewatkar, M. Moniruzzaman, J. Begun, B. P. Ross, M. McGuckin and A. Popat, *J. Colloid Interface Sci.*, 2021, **589**, 45-55.
98. R. Liao, Y. Liu, P. Lv, D. Wu, M. Xu and X. Zheng, *Drug Deliv.*, 2020, **27**, 1741-1749.

99. D. Duchene and A. Bochot, *Int. J. Pharm.*, 2016, **514**, 58-72.
100. H. S. Choi, T. Ooya, K. M. Huh and N. Yui, *Biomacromolecules*, 2005, **6**, 1200-1204.
101. H. S. Choi, A. Yamashita, T. Ooya, N. Yui, H. Akita, K. Kogure, R. Ito and H. Harashima, *Chembiochem.*, 2005, **6**, 1986-1990.
102. Z. Niu, I. Thielen, A. Barnett, S. M. Loveday and H. Singh, *J. Colloid Interface Sci.*, 2019, **546**, 312-323.
103. Y. Ma, Y. Zhang, Y. Liu, L. Chen, S. Li, W. Zhao, G. Sun, N. Li, Y. Wang, X. Guo, G. Lv and X. Ma, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2013, **101**, 1265-1273.
104. C. Shi, S. Zhong, Y. Sun, L. Xu, S. He, Y. Dou, S. Zhao, Y. Gao and X. Cui, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, 2020, **106**, 110251.
105. B. Joshi and A. Joshi, *Drug Deliv. Trans. Res.*, 2022, **12**, 1588-1604.
106. S. T. Meikle, Y. Pineiro, M. Banobre Lopez, J. Rivas and M. Santin, *Acta Biomater.*, 2016, **40**, 235-242.
107. O. Mertins, P. D. Mathews and A. Angelova, *Nanomaterials*, 2020, **10**.
108. S. Deshpande, E. Venugopal, S. Ramagiri, J. R. Bellare, G. Kumaraswamy and N. Singh, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, **6**, 17126-17133.
109. E. C. D.C, *Healthcare-associated infections: surgical site infections*, ECDC, accessed : April 2021.
110. K. T. Kim, M. Y. Eo, T. T. H. Nguyen and S. M. Kim, *Int. J. Implant. Dent.*, 2019, **5**, 10.
111. Z. Yang, Y. Xi, J. Bai, Z. Jiang, S. Wang, H. Zhang, W. Dai, C. Chen, Z. Gou, G. Yang and C. Gao, *Biomaterials*, 2021, **269**, 120534.
112. Y. Zhang, F. Wang, Q. Huang, A. B. Patil, J. Hu, L. Fan, Y. Yang, H. Duan, X. Dong and C. Lin, *Mater. Sci. Eng., C*, 2020, **110**, 110690.
113. J. Guo, G. Cao, X. Wang, W. Tang, W. Diwu, M. Yan, M. Yang, L. Bi and Y. Han, *Int. J. Nanomedicine*, 2021, **16**, 7249-7268.
114. C. Zhou, H. Song, J. L. C. Loh, J. She, L. Deng and B. Liu, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2018, **29**, 2106-2123.
115. L. Tian, Z. Zhang, B. Tian, X. Zhang and N. Wang, *RSC Adv.*, 2020, **10**, 4805-4816.
116. B. Tian, N. Wang, Q. Jiang, L. Tian, L. Hu and Z. Zhang, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2021, **32**, 63.
117. D. Wang and J. Zhang, *Polym. Test.*, 2020, **89**, 106609.
118. M. Fursatz, M. Skog, P. Sivler, E. Palm, C. Aronsson, A. Skallberg, G. Greczynski, H. Khalaf, T. Bengtsson and D. Aili, *Biomed. Mater.*, 2018, **13**, 025014.
119. M. Tavakolian, J. G. Munguia-Lopez, A. Valiei, M. S. Islam, J. M. Kinsella, N. Tufenkji and T. G. M. van de Ven, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2020, **12**, 39991-40001.
120. A. Jayakumar, V. K. Jose and J. M. Lee, *Small Methods*, 2020, **4**, 1900735.

121. C. T. Johnson, J. A. Wroe, R. Agarwal, K. E. Martin, R. E. Guldberg, R. M. Donlan, L. F. Westblade and A. J. Garcia, *PNAS*, 2018, **115**, 4960-4969.
122. J. Xu, Y. Liu and S. H. Hsu, *Molecules*, 2019, **24**.
123. L. Zhang, P. Yan, Y. Li, X. He, Y. Dai and Z. Tan, *Ind. Crops Prod.*, 2020, **145**, 112126.
124. M. Araki, H. Tao, N. Nakajima, H. Sugai, T. Sato, S. H. Hyon, T. Nagayasu and T. Nakamura, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2007, **134**, 1241-1248.
125. F. Takai, T. Takeda, K. Yamazaki, T. Ikeda, S. H. Hyon, K. Minatoya and H. Masumoto, *Gen. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2020, **68**, 793-800.
126. M. Takaoka, T. Nakamura, H. Sugai, A. J. Bentley, N. Nakajima, N. J. Fullwood, N. Yokoi, S. H. Hyon and S. Kinoshita, *Biomaterials*, 2008, **29**, 2923-2931.
127. W. Hyon, S. Shibata, E. Ozaki, M. Fujimura, S. H. Hyon and K. Matsumura, *Carbohydr. Polym.*, 2022, **278**, 118949.
128. S. H. Hyon, N. Nakajima, H. Sugai and K. Matsumura, *J. Biomed. Mater. Res., A*, 2014, **102**, 2511-2520.
129. M. Morishima, A. Marui, S. Yanagi, T. Nomura, N. Nakajima, S. H. Hyon, T. Ikeda and R. Sakata, *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.*, 2010, **11**, 52-55.
130. Y. Togo, K. Takahashi, K. Saito, H. Kiso, B. Huang, H. Tsukamoto, S. H. Hyon and K. Bessho, *Stem Cells Int.*, 2013, **2013**, 634379.
131. L. Gao, J. Chen, W. Feng, Q. Song, J. Huo, L. Yu, N. Liu, T. Wang, P. Li and W. Huang, *Biomater. Sci.*, 2020, **8**, 6930-6945.
132. X. Yang, P. Li, W. Tang, S. Du, M. Yu, H. Lu, H. Tan and X. Xing, *Carbohydr. Polym.*, 2021, **251**, 117040.
133. X. Yang, B. Wang, D. Sha, Y. Liu, J. Xu, K. Shi, C. Yu and X. Ji, *Polymer*, 2021, **212**, 123155.
134. C. Cheng, X. Zhang, Y. Meng, Z. Zhang, J. Chen and Q. Zhang, *Soft. Matter.*, 2017, **13**, 3003-3012.
135. C. Cheng, X. Zhang, Y. Meng, L. Chen and Q. Zhang, *J. Mater. Chem., B.*, 2017, **5**, 8487-8497.
136. N. Lopez Mora, M. Owens, S. Schmidt, A. F. Silva and M. Bradley, *Materials (Basel)*, 2020, **13**.
137. L. Zhou, Y. Xi, Y. Xue, M. Wang, Y. Liu, Y. Guo and B. Lei, *Adv. Funct. Mater.*, 2019, **29**, 1806883.
138. N. Pandey, L. F. Soto-Garcia, J. Liao, Z. Philippe, K. T. Nguyen and Y. Hong, *Biomater. Sci.*, 2020, **8**, 1240-1255.
139. C. Zhang, B. Wu, Y. Zhou, F. Zhou, W. Liu and Z. Wang, *Chem. Soc. Rev.*, 2020, **49**, 3605-3637.

140. A. Khan, M. Xu, T. Wang, C. You, X. Wang, H. Ren, H. Zhou, A. Khan, C. Han and P. Li, *Biosci. Rep.*, 2019, **39**.
141. M. Xu, A. Khan, T. Wang, Q. Song, C. Han, Q. Wang, L. Gao, X. Huang, P. Li and W. Huang, *ACS Appl. Bio. Mater.*, 2019, **2**, 3329-3340.
142. X. Qi, W. Pan, X. Tong, T. Gao, Y. Xiang, S. You, R. Mao, J. Chi, R. Hu, W. Zhang, H. Deng and J. Shen, *Carbohydr. Polym.*, 2021, **264**, 118046.
143. S. Li, N. Chen, Y. Li, X. Li, Q. Zhan, J. Ban, J. Zhao, X. Hou and X. Yuan, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2020, **153**, 1251-1261.
144. R. Wang, J. Li, W. Chen, T. Xu, S. Yun, Z. Xu, Z. Xu, T. Sato, B. Chi and H. Xu, *Adv. Funct. Mater.*, 2017, **27**, 1604894.
145. M. P. Tian, A. D. Zhang, Y. X. Yao, X. G. Chen and Y. Liu, *Carbohydr. Polym.*, 2021, **261**, 117878.
146. A. G. Gallagher, J. A. Alorabi, D. A. Wellings, R. Lace, M. J. Horsburgh and R. L. Williams, *Adv. Healthc. Mater.*, 2016, **5**, 2013-2018.
147. A. G. Gallagher, K. McLean, R. M. K. Stewart, D. A. Wellings, H. E. Allison and R. L. Williams, *Immunol. Microbiol.*, 2017, **58**, 4499-4505.
148. S. Kennedy, R. Lace, C. Carserides, A. G. Gallagher, D. A. Wellings, R. L. Williams and H. J. Levis, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2019, **30**, 102.
149. S. M. Kennedy, P. Deshpande, A. G. Gallagher, M. J. Horsburgh, H. E. Allison, S. B. Kaye, D. A. Wellings and R. L. Williams, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2020, **61**, 18.
150. S. M. Kennedy, P. Deshpande, A. G. Gallagher, M. J. Horsburgh, H. E. Allison, S. B. Kaye, D. A. Wellings and R. L. Williams, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2022, **63**, 11.
151. X. Wang, R. Song, M. Johnson, S. A. Z. He, C. Milne, X. Wang, I. Lara-Saez, Q. Xu and W. Wang, *Materials (Basel)*, 2021, **14**.
152. F. Wahid, J. J. Yin, D. D. Xue, H. Xue, Y. S. Lu, C. Zhong and L. Q. Chu, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2016, **88**, 273-279.
153. Y. Wang, H. Cao and X. Wang, *Mater. Chem. Phys.*, 2020, **248**, 122902.
154. G. Singh, A. Nayal, S. Malhotra and V. Koul, *Carbohydr. Polym.*, 2020, **247**, 116757.
155. W. Nie, X. Yuan, J. Zhao, Y. Zhou and H. Bao, *Carbohydr. Polym.*, 2013, **96**, 342-348.
156. E. Badali, M. Hosseini, M. Mohajer, S. Hassanzadeh, S. Saghati, J. Hilborn and M. Kahanmohammadi, *Pol. Sci., A*, 2022, **63**, 1-22.
157. R. Wang, B. Zhou, W. Liu, X. H. Feng, S. Li, D. F. Yu, J. C. Chang, B. Chi and H. Xu, *J. Biomater. Appl.*, 2015, **29**, 1167-1179.
158. X. Zhu, T. Gan, X. Wang, Y. Wang, H. Zhang and Q. Han, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2021, **168**, 143-151.
159. G. L. Duffy, H. Liang, R. L. Williams, D. A. Wellings and K. Black, *Mater. Sci. Eng., C*, 2021, **131**, 112476.

160. V. Gribova, F. Boulmedais, A. Dupret-Bories, C. Calligaro, B. Senger, N. E. Vrana and P. Lavalley, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2020, **12**, 19258-19267.
161. K. Salma-Ancane, A. Scegljovs, E. Tracuma, J. K. Wychowanec, K. Aunina, A. Ramata-Stunda, V. Nikolajeva and D. Loca, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2022, **208**, 995-1008.
162. R. Wang, Q. Li, B. Chi, X. Wang, Z. Xu, Z. Xu, S. Chen and H. Xu, *Chem. Commun. (Camb)*, 2017, **53**, 4803-4806.
163. Z. Meng, Y. He, F. Wang, R. Hang, X. Zhang, X. Huang and X. Yao, *ACS Appl. Bio. Mater.*, 2021, **4**, 2713-2722.
164. J. Yuan, D. Zhang, X. He, Y. Ni, L. Che, J. Wu, B. Wu, Y. Wang, S. Wang, D. Sha, S. Y. Zheng and J. Yang, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2021, **190**, 754-762.
165. C. Zhou, P. Li, X. Qi, A. R. Sharif, Y. F. Poon, Y. Cao, M. W. Chang, S. S. Leong and M. B. Chan-Park, *Biomaterials*, 2011, **32**, 2704-2712.
166. V. P. Gray, C. D. Amelung, I. J. Dutti, E. G. Laudermlch, R. A. Letteri and K. J. Lampe, *Acta Biomater*, 2022, **140**, 43-75.
167. Y. Fan, G. Ren, Y. Cui, H. Liu, S. Li, Y. Tian, G. Wang, C. Peng, Y. Wang and D. Wu, *Materials & Design*, 2023, **229**, 111862.
168. T. Yu, Y. Hu, W. He, Y. Xu, A. Zhan, K. Chen, M. Liu, X. Xiao, X. Xu, Q. Feng and L. Jiang, *Mater Today Bio*, 2023, **19**, 100558.
169. W. Cao and C. Gao, *Polymer*, 2020, **186**, 122082.
170. L. Huang, Z. Zhu, D. Wu, W. Gan, S. Zhu, W. Li, J. Tian, L. Li, C. Zhou and L. Lu, *Carbohydr Polym*, 2019, **225**, 115110.
171. Z. M. Khan, E. Wilts, E. Vlaisavljevich, T. E. Long and S. S. Verbridge, *Acta Biomater.*, 2022, **144**, 266-278.
172. F. Guo, Y. Liu, S. Chen, Y. Lin and Y. Yue, *Int J Biol Macromol*, 2023, **230**, 123256.
173. L. E. Jansen, L. J. Negron-Pineiro, S. Galarza and S. R. Peyton, *Acta Biomater*, 2018, **70**, 120-128.
174. J. Liu, W. Jiang, Q. Xu and Y. Zheng, *Gels*, 2022, **8**.
175. V. Gribova, F. Boulmedais, A. Dupret-Bories, C. Calligaro, B. Senger, N. E. Vrana and P. Lavalley, *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, **12**, 19258-19267.
176. F. Ahmadi, Z. Oveisi, S. Mohammadi Samani and Z. Amoozgar, *Research in Pharmaceutical Sciences*, 2015, **10**, 1-16.
177. R. Lev and D. Seliktar, *J R Soc Interface*, 2018, **15**.
178. W. Han, B. Zhou, K. Yang, X. Xiong, S. Luan, Y. Wang, Z. Xu, P. Lei, Z. Luo, J. Gao, Y. Zhan, G. Chen, L. Liang, R. Wang, S. Li and H. Xu, *Bioact Mater*, 2020, **5**, 768-778.
179. X. Yan, W. W. Fang, J. Xue, T. C. Sun, L. Dong, Z. Zha, H. Qian, Y. H. Song, M. Zhang, X. Gong, Y. Lu and T. He, *ACS Nano*, 2019, **13**, 10074-10084.

180. A. Sun, X. He, L. Li, T. Li, Q. Liu, X. Zhou, X. Ji, W. Li and Z. Qian, *NPG Asia Materials*, 2020, **12**.
181. J. Zhou, R. Cha, Z. Wu, C. Zhang, Y. He, H. Zhang, K. Liu, M. S. Fareed, Z. Wang, C. Yang, Y. Zhang, W. Yan and K. Wang, *Nano Today*, 2023, **49**, 101801.
182. B. Jia, G. Li, E. Cao, J. Luo, X. Zhao and H. Huang, *Mater Today Bio*, 2023, **19**, 100582.
183. L. Zhou, D. Lei, Q. Wang, X. Luo and Y. Chen, *ACS Appl Bio Mater*, 2020, **3**, 5357-5366.
184. W. Wang, R. Han, K. Tang, S. Zhao, C. Ding and X. Luo, *Anal Chim Acta*, 2021, **1154**, 338295.
185. A. Gallastegui, M. B. Spesia, I. E. dell'Erba, C. A. Chesta, C. M. Previtali, R. E. Palacios and M. L. Gomez, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, **102**, 896-905.
186. J. Li and D. J. Mooney, *Nat Rev Mater*, 2016, **1**.
187. Y.-J. Lin, B.-Y. Chang Chien and Y.-H. Lee, *European Polymer Journal*, 2022, **175**, 111364.
188. M. M. Al-Rajabi and Y. H. Teow, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 2023, **31**, 100939.
189. M. Du, J. Jin, F. Zhou, J. Chen and W. Jiang, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2023, **222**, 113063.
190. X. Xie, H. Lei and D. Fan, *Journal of Materials Science & Technology*, 2023, **144**, 198-212.
191. H. Suo, M. Hussain, H. Wang, N. Zhou, J. Tao, H. Jiang and J. Zhu, *Biomacromolecules*, 2021, **22**, 3049-3059.
192. A. A. Aimetti, A. J. Machen and K. S. Anseth, *Biomaterials*, 2009, **30**, 6048-6054.
193. C.-Y. Wang, M. Sun, Z. Fan and J.-Z. Du, *Chinese Journal of Polymer Science* 2022, **40**, 1154-1164.
194. J. Zhou, D. Yao, Z. Qian, S. Hou, L. Li, A. T. A. Jenkins and Y. Fan, *Biomaterials*, 2018, **161**, 11-23.

Chapitre 2. Matériels et Méthodes

Chapitre 2. Matériels et Méthodes

2.1. Matériels	83
2.1.1. Les « Multiple Antigenic Peptides » de poly(L-arginine)	83
2.1.2. Matériels utilisés lors de la synthèse des hydrogels ϵ -PLL / PEGDA	84
2.1.3. Matériels utilisés lors de la synthèse des hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal	85
2.1.4. Les solutions tampons et les milieux de culture	87
2.2. Formation des hydrogels	88
2.2.1. Les hydrogels de ϵ -PLL / PEGDA	88
2.2.2. Les hydrogels tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal	91
2.3. Tests de microbiologie	93
2.3.1. Concentration minimale inhibitrice	93
2.3.2. Activité antibactérienne : test direct et en extrait	93
2.3.2.1. Activité antibactérienne directe	93
2.3.2.2. Activité antibactérienne des extraits	94
2.3.3. Cinétique de la lyse des bactéries	95
2.4. Tests de culture cellulaire	96
2.4.1. Tests de cytotoxicité	96
2.4.1.1. Cytotoxicité directe	97
2.4.1.2. Cytotoxicité en extrait	97
2.4.2. Quantification du monoxyde d'azote (NO) libéré par les macrophages	98
2.4.3. Suivi de la migration cellulaire : modèle de cicatrisation	99
2.4.4. Hémolyse des globules rouges en présence de peptides en solution	101
2.5. Microscope confocal	102
2.5.1. Principe de fonctionnement	102
2.5.2. Marquage des bactéries à la surface de l'hydrogel	103
2.5.3. Mobilité des chaînes de ϵ -PLL par FRAP	104
2.6. Rhéologie : temps de gel et module élastique	107

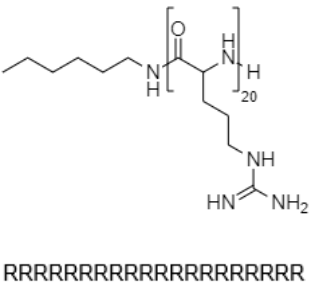
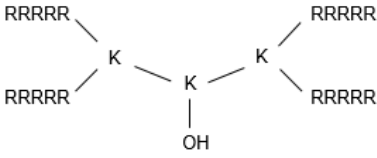
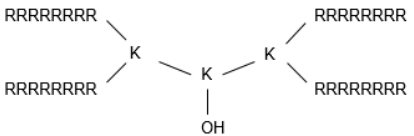
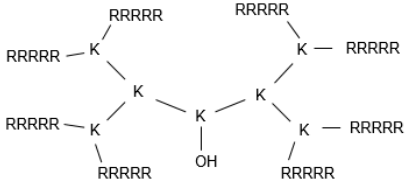
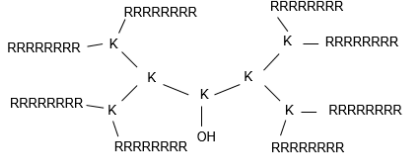
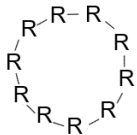
2.7. Taux de gonflement et de dégradation	107
2.7.1. Mesure du taux de gonflement des hydrogels.....	108
2.7.2. Mesure du taux de dégradation	108
2.8. Test d'interaction peptide-LPS	109
2.9. Suivi de la libération du polypeptide clivable par la GluC	109
Bibliographie	111

2.1. Matériels

2.1.1. Les « Multiple Antigenic Peptides » de poly(L-arginine)

Les peptides qui ont été étudiés au cours de cette thèse sont des peptides synthétiques développés en laboratoire par la société Pepmic (Chine) (**Tableau 2.1.**). Ces peptides présentent un cœur constitué de lysines auxquels des chaînes de poly(L-arginine) (PAR) de différentes longueurs peuvent être attachées de manière covalente ¹. En effet, une lysine possède deux amines primaires. Il est donc possible d'attacher trois acides aminés sur chaque lysine (un sur la fonction acide carboxylique et deux sur les fonctions amines). Ainsi, en fonction du nombre de lysines que possède le cœur, des peptides antigéniques multiples (MAP) en étoile possédant différents nombres de bras peuvent être formés. Dans cette thèse, uniquement des peptides MAP possédant quatre et huit bras ont été étudiés. Ensuite, chaque bras peut être constitué du nombre d'acides aminés souhaité. Dans le cadre de ce travail, nous avons étudié des peptides possédant 5 et 8 arginines sur chaque bras. Enfin, ces peptides MAP sont comparés avec des polymères PAR linéaires et avec un peptide PAR cyclique fabriqués par synthèse peptidique par Pepmic (Chine). Tous les peptides sont livrés sous forme de poudre.

Tableau 2.1. Structures et masses moléculaires des peptides MAP. L'acide aminé arginine est représenté par la lettre R et l'acide aminé lysine par la lettre K. Tous les peptides présentés dans le tableau ci-dessous ont été fabriqués par la société Pepmic

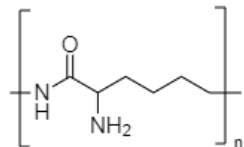
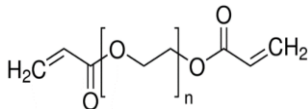
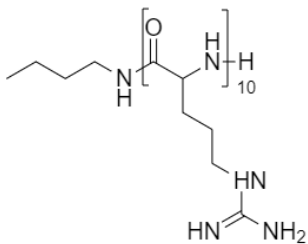
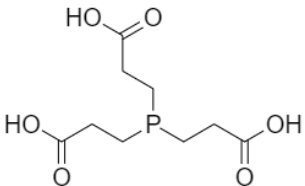
Nom molécule	Structure molécule	Acronyme	Masse molaire
Poly(L-arginine) de 20 arginines		PAR20	Mw = 2 599.8 Da
Polymère MAP possédant 4 bras de poly(L-arginine) de 5 arginines		R5MAP4	Mw = 3 526.05 Da
Polymère MAP possédant 4 bras de poly(L-arginine) de 8 arginines		R8MAP4	Mw = 5 399.9 Da
Polymère MAP possédant 8 bras de poly(L-arginine) de 5 arginines		R5MAP8	Mw = 7 163.8 Da
Polymère MAP possédant 8 bras de poly(L-arginine) de 8 arginines		R8MAP8	Mw = 10 911.7 Da
Poly(L-arginine) cyclique de 10 arginines		Cyclo(R10)	Mw = 1562 Da

2.1.2. Matériels utilisés lors de la synthèse des hydrogels ϵ -PLL / PEGDA

Les différents composés utilisés lors de la synthèse des hydrogels à base de poly(éthylène glycol) diacrylate et de ϵ -poly(L-lysine) (nommés ensuite hydrogels ϵ -PLL / PEGDA) sont

récapitulés dans le **Tableau 2.2**. Tous les réactifs utilisés sont sous forme de poudre, sauf le poly(éthylène glycol) diacrylate qui est sous forme liquide à température ambiante.

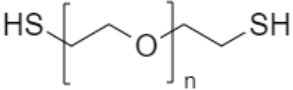
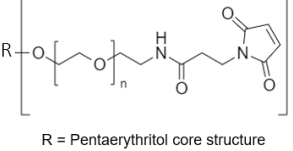
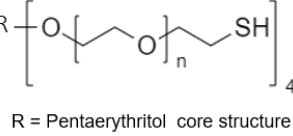
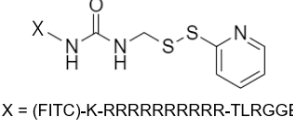
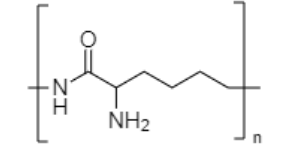
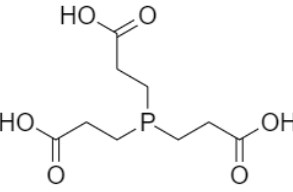
Tableau 2.2. Composés utilisés lors de la synthèse des hydrogels ϵ -PLL / PEGDA

Nom molécule	Structure molécule	Acronyme	Masse molaire	Fournisseur
ϵ -poly(L-lysine)		ϵ -PLL	Mw = 3500-4500 Da	Carbosynth
Poly(éthylène glycol) diacrylate		PEGDA	Mw = 700 Da	Sigma Aldrich
Poly(L-arginine) à 10 arginines		PAR10	Mw = 1 900 Da	Alamanda Polymers
Tris(2-carboxyethyl)phosphine		TCEP	Mw = 286.65 Da	Sigma Aldrich

2.1.3. Matériels utilisés lors de la synthèse des hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal

Les composés utilisés lors de la synthèse des hydrogels à base de poly(éthylène glycol) tétramaléimide, poly(éthylène glycol) tétrathiol et poly(éthylène glycol) dithiol (nommés par la suite hydrogels PEG-SH / PEG-Mal) sont récapitulés dans le **Tableau 2.3**. Tous les polymères et réactifs suivants sont livrés sous forme de poudre.

Tableau 2.3. Composés utilisés dans la synthèse des hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal. K représente la lysine, R représente l'arginine, T la thréonine, L la leucine, G la glycine, E l'acide glutamique et C la cystéine.

Nom molécule	Structure molécule	Acronyme	Masse molaire	Fournisseur
Poly(éthylène glycol) dithiol		HS-PEG-SH	Mw = 3 500 Da	Jenkem Technology
Poly(éthylène glycol) tétramaléimide	 R = Pentaerythritol core structure	Tetra-PEG-Mal	Mw = 10 000 Da	
Poly(éthylène glycol) tétrathiol	 R = Pentaerythritol core structure	Tetra-PEG-SH	Mw = 20 000 Da	
polypeptide clivable K(FITC)- RRRRRRRRRR- TLRGGEC-STP	 X = (FITC)-K-RRRRRRRRRR-TLRGGE-	FITC-PAR10-PC-STP PC = TLRGGEC	Mw = 2 923 Da	Pepmic
ε-poly(L-lysine)		ε-PLL	Mw = 3500-4500 Da	Carbosynth
Tris(2-carboxyethyl)phosphine		TCEP	Mw = 286.65 Da	Sigma Aldrich

Un polypeptide composé de 10 monomères d'arginine suivis d'une séquence spécifiquement clivable par une enzyme sécrétée par *Staphylococcus aureus* a été synthétisé par Pepmic à notre demande (voir polypeptide clivable dans tableau 2.3). Ce polypeptide a été élaboré de manière à présenter tout d'abord un motif possédant des propriétés antimicrobiennes connues via une chaîne de PAR de dix arginines (PAR10). Ces chaînes de PAR sont en effet très étudiées dans le laboratoire UMR_S 1121 de l'Inserm ². Une sonde fluorescente, l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), est greffée sur une lysine en amont du PAR10. Ensuite, une séquence clivable par une enzyme est ajoutée. La séquence choisie est la

suivante : TLRGGE. En effet, la protéase à sérine V8 (GluC) sécrétée par la bactérie *S.aureus* est capable de cliver des liaisons peptidiques du côté C-terminal de l'acide glutamique ³. Le choix de cette séquence est issu d'une thèse précédente soutenue au laboratoire par Lorène Tallet ⁴. Enfin, la fonction thiol de la cystéine de ce polypeptide est protégée par un groupement thiopyridone afin d'éviter la formation de ponts disulfures. Ce groupement pourra être ensuite facilement déprotéger par un réducteur (le tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)).

2.1.4. Les solutions tampons et les milieux de culture

Différents tampons et milieux de culture ont été utilisés au cours de ce travail de thèse et sont référencés dans les **Tableau 2.4.** et **Tableau 2.5.** Les tampons sont préparés dans de l'eau ultrapure de résistivité égale à 18 MΩ.cm à 25°C.

Tableau 2.4. *Tampons utilisés lors de ces travaux*

Tampons	Composition	pH	Utilisation
Tampon phosphate salin (PBS)	- Chlorure de potassium 0.2 g.L⁻¹ - Phosphate de potassium monobasique anhydre 0.2 g.L⁻¹ - Chlorure de sodium 8 g.L⁻¹ - Phosphate de sodium dibasique anhydre 1.15 g.L⁻¹	7.3	Mesure de gonflement et de dégradation des hydrogels
Tampon Tris / NaCl	- Chlorure de sodium (NaCl) 0.15 M - Tris-(hydroxyméthylaminométhane) (Tris) 10 mM - HCl 1M pour ajuster le pH	7.4	Rinçage des matériaux Dissolution du TCEP
Tampon Tris	- Tris-(hydroxyméthylaminométhane) (Tris) 50 mM - HCl 1M pour ajuster le pH	7	Etude de l'interaction peptide / LPS par un test de déplacement de la fluorescence avec le Bodipy-TR-cadavérine

Tableau 1.5. Liste des milieux utilisés lors de cette thèse

Milieux de culture	Fournisseur	Utilisation
Millieu Mueller Hinton (MHB)	BD	Culture des souches bactériennes <i>S. aureus</i> ATCC25923, <i>MRSA</i> , <i>E. coli</i> ATCC25922, <i>P. aeruginosa</i> ATCC27853
Bouillon cœur-cervelle (BHI)	PanReacAppliChem	Culture des bactéries <i>E. faecalis</i> ATCC29212
Millieu Sabouraud (SAB)	BD	Culture des champignons <i>C. albicans</i> ATCC18804 et <i>A. fumigatus</i>
Dulbecco's Modified Eagle Medium avec 4.5 g.L⁻¹ de glucose + 10 % de sérum de veau fœtal + 1 % de pénicilline-streptomycine (DMEM « High Glucose »)	Dutscher	Culture des fibroblastes de souris BALB/3T3
Dulbecco's Modified Eagle Medium avec 4.5 g.L⁻¹ de glucose + 5 % de sérum de veau fœtal faible endotoxine + 1 % de pénicilline-streptomycine (DMEM « High Glucose »)	Dutscher	Culture des macrophages murins RAW 264.7
Dulbecco's Modified Eagle Medium avec 1 g.L⁻¹ de glucose + 10 % de sérum de veau fœtal + 1 % de pénicilline-streptomycine (DMEM « Low Glucose »)	Dutscher	Cultures des cellules épithéliales Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)

2.2. Formation des hydrogels

2.2.1. Les hydrogels de ϵ -PLL / PEGDA

L'étude des premiers hydrogels élaborés dans ce travail sera présentée dans le chapitre 4. Ces derniers sont synthétisés à partir de deux polymères : des chaînes de ϵ -PLL et des chaînes de PEGDA. Ces hydrogels ont été développés en se basant sur les travaux de Cao *et al.* ⁵. La formation d'un réseau 3D se fait grâce à une addition de Michael entre les fonctions amines du polymère ϵ -PLL et les fonctions acrylates du PEGDA en catalyse basique (**Figure 2.1.**). Cette méthode permet la formation de liaisons covalentes entre les deux polymères, formant le réseau 3D de l'hydrogel. Ainsi, dans cette synthèse, aucun photoinitiateur n'est nécessaire afin amorcer la réaction qui s'effectue par catalyse basique. Une fois les hydrogels formés, les fonctions acrylates n'ayant pas réagi sont réduites grâce à un réducteur : le TCEP.

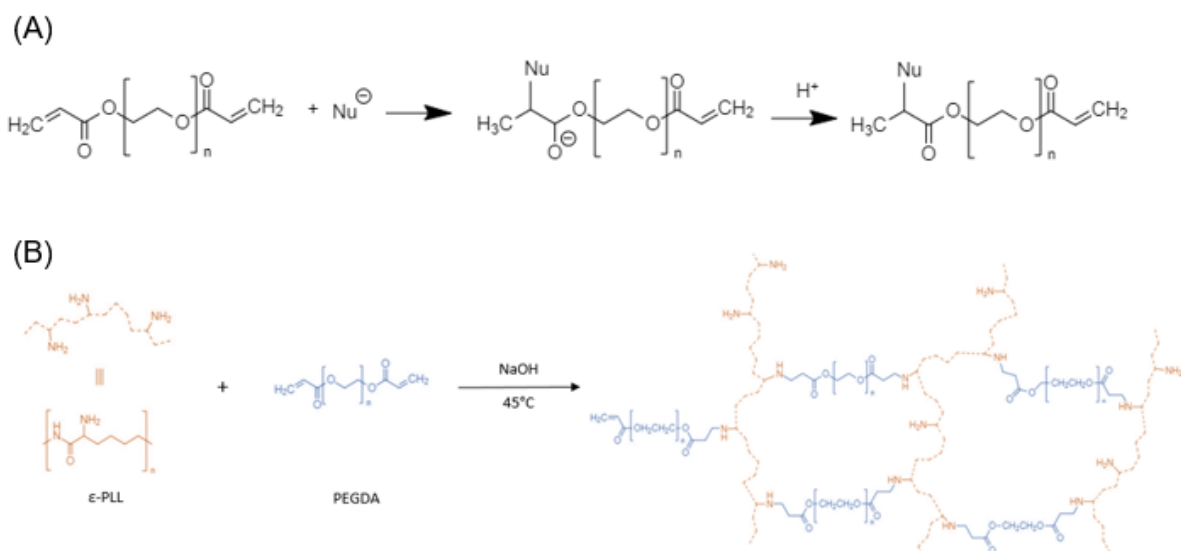


Figure 2.1. (A) Mécanisme d'une addition de Michael entre des chaînes de PEGDA avec un nucléophile (dans notre étude le nucléophile sera le groupement amine des chaînes de ϵ -PLL). (B) Réaction entre les chaînes de ϵ -PLL et de PEGDA lors de la formation du réseau 3D. L'hydroxyde de sodium joue un rôle de catalyseur permettant la déprotonation des amines des chaînes de ϵ -PLL et ainsi la réaction entre les fonctions amines et les fonctions acrylates du second polymère. Le réseau 3D se forme car plusieurs fonctions amines d'une même molécule de ϵ -PLL vont réagir avec différentes fonctions acrylates, permettant ainsi une réticulation chimique.

Ainsi, pour la formation de ces hydrogels, les chaînes de ϵ -PLL sont solubilisées à différentes concentrations dans une solution d'hydroxyde de sodium à 0.15 M (NaOH 0.15 M) de manière à déprotoner les amines. Les chaînes de PEGDA sont diluées dans de l'eau ultrapure de résistivité 18 M Ω .cm. Les deux réactifs sont ensuite mélangés à un ratio 1 / 1 en volume, avant d'être placés dans un moule pour gélification. Des seringues de 2.5 mL ont été utilisés comme moules pour les tests de viabilité cellulaire, d'étude par vidéo microscopie, de gonflement et dégradation. Les hydrogels ont ensuite été découpés et pesés afin de pouvoir comparer les résultats entre eux. Un hydrogel de 200 μ L pèse entre 245 et 250 mg en fonction des conditions de préparation. En vue des tests d'activité antimicrobienne, les hydrogels ont été directement gélifiés au fond des puits d'une plaque à 24 puits. A cette fin, 200 μ L de milieu réactionnel ont été introduits par puits.

Enfin, les tests *in vivo* ont été effectués sur des compresses Medicomp (Hartmann, Allemagne) de 1 cm² dans lesquelles 200 μ L de mélange réactionnel ont été introduits avant gélification.

Les moules ont été ensuite placés dans une étuve à 45°C pendant 2 h afin d'augmenter la cinétique de réaction entre les fonctions amines et les groupements acrylates. Une fois les hydrogels gélifiés, ils ont été rincés avec du TCEP à 5 mg.mL⁻¹ dans du tampon Tris 10 mM / NaCl 0.15 M (Tris / NaCl) pendant 4 h. Un hydrogel de 200 μ L a été rincé avec

500 μL de cette solution. Enfin deux derniers rinçages ont été effectués avec du Tris / NaCl (même volume que lors du rinçage au TCEP précédent) : un rinçage court d'une minute et un rinçage long d'une heure. Enfin, pour les tests biologiques, les échantillons ont été passés sous lampe UV (365 nm) sous PSM pendant 30 minutes.

Différentes concentrations en polymères et différents ratios entre amines et acrylates ont été testés (**Tableau 2.6.**). Ces premières études ont permis notamment de connaître les limites de concentrations permettant la gélification des hydrogels.

Tableau 2.6. *Tableau présentant les différentes conditions d'hydrogels qui ont été testées. Le ratio entre les fonctions amines et acrylates a été modifié ainsi que les concentrations en chaînes de PEGDA et de ϵ -PLL et la gélification après deux heures de réaction a été contrôlée pour toutes les conditions. Uniquement les conditions utilisées pour l'hydrogel n°1 n'ont pas permis la gélification d'un hydrogel.*

Numéro condition	Concentration PEGDA (mg.mL^{-1})	Concentration ϵ -PLL (mg.mL^{-1})	Ratio amine / acrylate	Gélification
1	200	50	0.68	Non
2		100	1.3	Oui
3		200	2.7	Oui
4		400	5.4	Oui
5		500	6.74	Oui
6	50	300	16.2	Oui
7	100		8.3	Oui
8	200		4.2	Oui
9	350		2.3	Oui
10	500		1.6	Oui
11	100	100	2.7	Oui
12		500	13.5	Oui
13	350	100	0.8	Oui
14		500	3.9	Oui

Dans un second temps du travail de thèse, des chaînes de PAR10 ont été ajoutées dans la formulation des hydrogels. Pour cela, les chaînes de PAR10 solubilisées à 10 mg.mL^{-1} dans de l'eau ultra pure de résistivité $18 \text{ M}\Omega.\text{cm}$ ont été ajoutées à un ratio 8:1 en volume par rapport au mélange ϵ -PLL / PEGDA. Ainsi, un hydrogel de $225 \mu\text{L}$ est constitué de $100 \mu\text{L}$ de polymère PEGDA, $100 \mu\text{L}$ de polymère ϵ -PLL et $25 \mu\text{L}$ de chaînes de PAR10. Des concentrations de polymère PEGDA entre 50 et 350 mg.mL^{-1} ont été utilisés. Le polymère ϵ -PLL a été utilisé à des concentrations comprises entre 100 et 500 mg.mL^{-1} afin d'obtenir un hydrogel.

Le mélange réactionnel a été ensuite placé à l'étuve à 45°C pendant 2 h pour gélification. Les hydrogels ont ensuite été rincés de la même manière que précédemment à savoir un rinçage de 4 h avec le TCEP à 5 mg.mL⁻¹ dans le tampon Tris / NaCl, puis deux rinçages au tampon Tris / NaCl.

2.2.2. Les hydrogels tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal

Le chapitre 5 présentera le développement d'un autre type d'hydrogel constitué également de chaînes de PEG. Cependant, dans cette dernière étude, des polymères de PEGs fonctionnalisés avec des fonctions maléimides et des fonctions thiols ont été utilisés pour réticuler selon la méthode « click » de l'addition de Michael. De plus, les chaînes de PEGs maléimides utilisés sont constitués de 4 bras et donc fonctionnalisés avec 4 fonctions réactives maléimides. Les fonctions maléimides et thiols sont des fonctions très réactives qui permettent le développement d'un réseau 3D très rapidement et facilement. De plus, les liaisons covalentes qui résultent de la réaction sont des liaisons fortes et sont difficilement hydrolysables, ce qui permet d'obtenir des hydrogels stables dans les milieux de culture aqueux.

Le polypeptide clivable précédemment présenté (TLRGGEC) a été fonctionnalisé avec un groupement thiol et a été ajouté lors de la synthèse de l'hydrogel (**Figure 2.2.**). Ce polypeptide est ainsi lié de manière covalente à l'intérieur de l'hydrogel, et ne peut être libéré que lors du clivage d'une liaison peptidique ou lors de la dégradation de l'hydrogel, ce qui permet un contrôle de la libération des peptides.

Ainsi, dans un premier temps, le polypeptide clivable FITC-PAR10-PC-SSTP a été déprotégé par le TCEP. En effet, un groupement thiopyridone permettant la protection des fonctions thiols afin d'éviter la formation de pont disulfures avaient été ajoutés à la place du thiol de la cystéine. Pour cette déprotection, 1 mg de polypeptide a été dissout dans 450 µL d'eau ultra pure de résistivité 18 MΩ.cm, puis 50 µL de TCEP à 2 mg.mL⁻¹ dans l'eau ultra pure ont été ajoutés. Le mélange a été mis sous agitation pendant 15 min. Le polypeptide FITC-PAR10-PC-SH est obtenu à la suite de cette réduction. Ensuite, pour l'hydrogel tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal, les polymères tetra-PEG-SH et tetra-PEG-Mal ont été dissous à 100 mg.mL⁻¹ dans de l'eau ultra pure de résistivité 18 MΩ.cm, tandis que pour l'hydrogel HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal, les polymères HS-PEG-SH et tetra-PEG-Mal ont été dissous à 50 mg.mL⁻¹ dans de l'eau ultra pure de résistivité 18 MΩ.cm.

Dans un puits d'une plaque à 24 puits, ont été introduits 100 µL de tetra-PEG-Mal ainsi que 50 µL de polypeptide FITC-PAR10-PC-SH. La plaque est mise sous agitation pendant 15 minutes afin de permettre la réaction entre les fonctions thiols et les maléimides. Ensuite,

100 μL de tetra-PEG-SH (ou HS-PEG-SH en fonction de l'hydrogel synthétisé) sont ajoutés dans les différents puits. La plaque est mise une nouvelle fois sous agitation pendant 3 h afin de former le réseau 3D de l'hydrogel. Dans le cas des hydrogels tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal, la formation du réseau 3D se fait quasiment instantanément tandis que dans le cas des hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal, 2 h d'agitation sont nécessaires.

Une fois l'hydrogel formé, ils sont rincés deux fois avec un tampon Tris / NaCl. Le premier rinçage était un rinçage court d'une minute (500 μL de tampon ajouté et retiré pour un hydrogel de 250 μL) et le second était un rinçage long d'une heure (500 μL de tampon également). Les échantillons ont ensuite été passés aux UV pendant 30 min pour stérilisation.

Dans un second temps, de la ϵ -PLL est ajoutée dans les hydrogels afin d'améliorer les propriétés antibactériennes. Dans ce cas, les 50 μL de polypeptide clivable sont remplacés par 50 μL de ϵ -PLL à des concentrations entre 0 et 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans de l'eau ultra pure de résistivité 18 $\text{M}\Omega.\text{cm}$. Le même protocole que précédemment est ensuite suivi pour développer l'hydrogel.

De même, une fois la concentration en ϵ -PLL choisie, cette dernière est directement introduite dans la solution de FITC-PAR10-PC-SH, puis c'est 50 μL de ce mélange qui sont introduits dans le mélange réactionnel à la place de la FITC-PAR10-PC-SH seule.

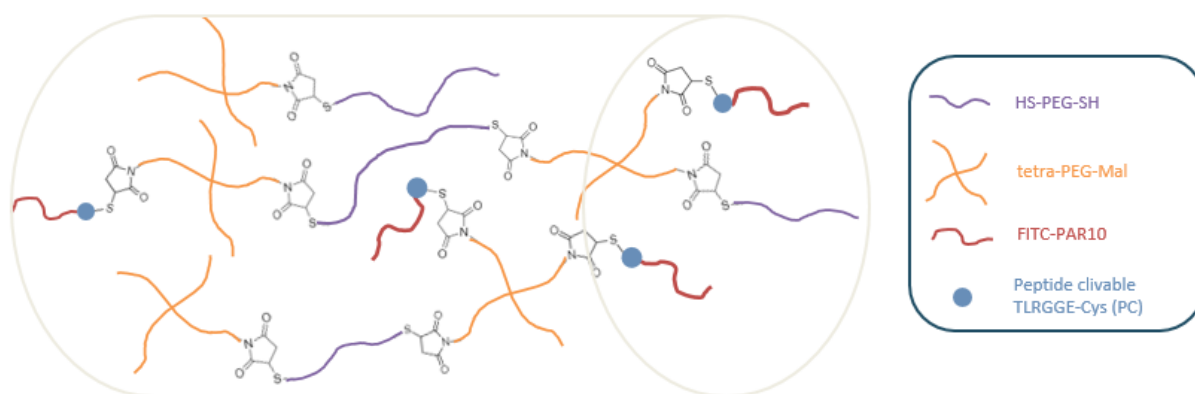


Figure 2.2. Structure interne de l'hydrogel HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal + FITC-PAR10-PC-SH. Les réactions entre les fonctions thiols et maléimides des chaînes de PEGs permettent la formation d'un réseau 3D. L'hydrogel formé est ainsi un hydrogel réticulé chimiquement, stable dans les milieux de culture bactériens. L'ajout du polypeptide clivable FITC-PAR10-PC-SH dans le mélange réactionnel en amont de la gélification permet de lier de manière covalente le polypeptide au réseau de l'hydrogel grâce à la réaction entre sa fonction thiol et les fonctions maléimides des chaînes de PEGs. Ainsi, le polypeptide ne devrait être libéré qu'en présence d'un agent capable de cliver le polypeptide ou bien lors de la dégradation de l'hydrogel.

2.3. Tests de microbiologie

Plusieurs souches bactériennes et fongiques ont été utilisées pour les tests d'activité antimicrobienne. Ces souches ont été choisies car elles font partie des souches couramment retrouvées dans les infections nosocomiales, notamment *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Candida albicans*^{6, 7}.

Les bactéries à Gram positif qui ont été utilisées sont : *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) et *Enterococcus faecalis* ATCC29212. Nous avons utilisé également les bactéries à Gram négatif suivantes : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 et *Escherichia coli* ATCC25922. Enfin, un champignon a été étudié : *Candida albicans* ATCC18804. Toutes les souches bactériennes ont été cultivées dans du milieu Mueller Hinton (MHB), à l'exception de l'*E. faecalis* qui a été cultivé dans du bouillon cœur-cerveau (BHIB). Le champignon a été cultivé dans du milieu Sabouraud (SAB) (cf. **tableau 2.5.**).

2.3.1. Concentration minimale inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice (CMI) peut être calculée pour un composé en solution. Dans cette thèse, les CMI de différents peptides et polymères ont été déterminées. Pour cela, le peptide est mis en solution à différentes concentrations. Ensuite, le peptide est mis en contact d'un nombre connu de bactéries pendant 24 h à 37°C. La densité optique (DO) est mesurée pour chaque condition, puis la courbe des DOs est tracée en fonction de la concentration en peptide. Il est ensuite possible d'ajuster la courbe obtenue par une sigmoïde de la forme $y = y_0 + \frac{a}{1 + e^{-\frac{(x-x_0)}{b}}}$. Les paramètres de la sigmoïde sont établis afin de déterminer la CMI du peptide sur la souche bactérienne. La CMI est définie comme étant la concentration minimale permettant d'inhiber 99.9% des bactéries initialement présentes.

2.3.2. Activité antibactérienne : test direct et en extrait

Afin de quantifier l'activité antimicrobienne d'un matériau, deux tests ont été effectués : un premier test en direct, c'est-à-dire un test de l'activité lorsque les bactéries sont en contact de l'hydrogel, et un second en extrait, c'est-à-dire un test de l'activité antimicrobienne des hydrogels dégradés dans le milieu de culture (**Figure 2.3.A.**).

2.3.2.1. Activité antibactérienne directe

Pour le test de l'activité antimicrobienne en direct, des hydrogels de 200 µL ont été préparés dans une plaque à 24 puits, comme expliqué dans la partie 2.2.1. Les hydrogels ont été rincés

et passés sous lampe UV ($\lambda = 365$ nm) dans un PSM pour stérilisation pendant 30 min. Une suspension bactérienne à une concentration de 8×10^5 CFU.mL⁻¹ a également été préparée dans le milieu de culture bactérienne. Ensuite, 500 μ L de cette suspension bactérienne ont été introduits dans la plaque au contact des hydrogels. La plaque a été placée sous agitation dans un incubateur à 37°C pendant 24 h. Après ces 24 h, 80 μ L ont été prélevés dans chaque puits et introduits dans les puits d'une plaque à 96 puits, puis la DO a été mesurée à $\lambda = 595$ nm. Enfin, les DO ont été normalisées par rapport à deux contrôles : un contrôle positif qui correspond à la croissance des bactéries pendant 24 h dans 500 μ L de milieu de culture, et un contrôle négatif qui correspond à la croissance des bactéries pendant 24 h dans 500 μ L de milieu de culture contenant des antibiotiques (mélange tétracycline à une concentration finale de 1 μ g.mL⁻¹ dans le PBS / céfotaxime à une concentration finale de 0.01 μ g.mL⁻¹ dans le PBS pour les souches *S. aureus* ATCC25923, *MRSA*, et *E. coli* ATCC25922 ; chlorhexidine à une concentration finale de 2% pour les souches *P. aeruginosa* ATCC27853, *E. faecalis* ATCC29212 et *C. albicans* ATCC18804). La formule donnant le pourcentage de croissance bactérienne est la suivante :

$$\% \text{ croissance bactérienne} = \frac{DO (\text{échantillon}) - DO (\text{contrôle négatif})}{DO (\text{contrôle positif}) - DO (\text{contrôle négatif})} \times 100$$

2.3.2.2. Activité antibactérienne des extraits

Afin de vérifier si les propriétés antimicrobiennes des hydrogels sont dues au contact des bactéries avec leur surface (« contact killing ») ou bien si la diminution de la croissance bactérienne est provoquée par la dégradation du matériau et la libération de composés antimicrobiens dans le milieu, des tests d'activité antimicrobienne des matériaux extraits sont effectués (**Figure 2.3.B.**).

Pour ces expériences, des hydrogels de 200 μ L ont été développés dans une plaque de 24 puits, comme pour les tests d'activité directe. Après avoir rincé les hydrogels et les avoir placés sous lampe UV ($\lambda = 365$ nm) dans un PSM pendant 30 min, 500 μ L de milieu de culture bactérien sans bactéries ont été introduits dans les puits. La plaque de 24 puits a été placée dans un incubateur à 37°C pendant 24 h pour simuler la dégradation dans un milieu physiologique. Après ces 24 h, une suspension bactérienne à une concentration de 8×10^6 CFU.mL⁻¹ dans le milieu de culture a été préparée. Dans une plaque à 24 puits, 50 μ L de suspension bactérienne ont été introduits dans chaque puits, puis 450 μ L de milieu de culture ayant été placés au contact des hydrogels ont été ajoutés dans chaque puits. Des

contrôles ont été également préparés : un contrôle positif qui correspond à l'ajout de 50 μL de suspension bactérienne dans 450 μL de milieu de culture, et un contrôle négatif qui correspond à l'ajout de 50 μL de suspension bactérienne dans 450 μL de milieu de culture contenant des antibiotiques (mélange tétracycline à une concentration finale de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans le PBS / céfotaxime à une concentration finale de 0.01 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans le PBS pour les souches *S. aureus* ATCC25923, *MRSA*, et *E. coli* ATCC25922 ; chlorhexidine à une concentration finale de 2% pour les souches *P. aeruginosa* ATCC27853, *E. faecalis* ATCC29212 et *C. albicans* ATCC18804). Cette nouvelle plaque a été placée dans un incubateur à 37°C et sous agitation pendant 24 h. Après ces 24 h, de la même manière que pour les tests d'activité antimicrobienne directs, 80 μL de chaque puits ont été introduits dans un puits d'une plaque à 96 puits. La DO de chaque puits a été mesurée à $\lambda = 595 \text{ nm}$, et les DO mesurées pour les échantillons ont été normalisées par rapport aux contrôles positif et négatif avec la même formule que celle donnée dans la partie 2.3.2.1.

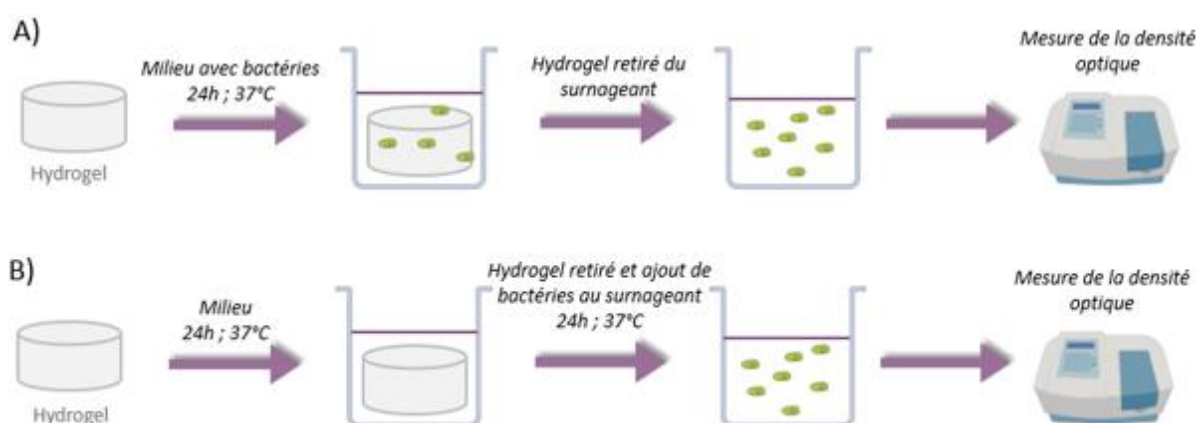


Figure 2.3. Représentation du protocole utilisé pour l'étude de l'activité antimicrobienne des hydrogels : en direct, les bactéries sont déposées directement sur l'hydrogel (A). En extrait, l'hydrogel est d'abord incubé pendant 24 h dans du milieu de culture, puis uniquement ce dernier est ajouté à une suspension bactérienne (B).

2.3.3. Cinétique de la lyse des bactéries

Afin d'étudier l'efficacité des propriétés antibactériennes des peptides en solution, la vitesse de la lyse des bactéries Gram positif *S. aureus* ATCC25923 et Gram négatif *P. aeruginosa* ATCC27853 a également été étudiée lors de cette thèse (« time-kill curves »). Cela nous a permis de comparer les profils de vitesse de lyse des bactéries en fonction du peptide utilisé et également de déterminer le temps de contact nécessaire afin de tuer toutes les bactéries présentes dans le milieu.

A cette fin, une suspension bactérienne de *S. aureus* ATCC25923 ou de *P. aeruginosa* ATCC27853 à concentration connue a été préparée dans le milieu de culture. Le peptide d'étude a ensuite été ajouté dans cette suspension à une concentration égale à la CMI, puis le tube a été placé dans un incubateur à 37°C sous agitation. Quelques microlitres de suspension ont été prélevés à 0, 1, 2, 4, 6 et 8 h et ont été dilués à différentes concentrations, puis 100 µL correspondant à chaque concentration ont été étalés sur une gélose Mueller-Hinton afin d'isoler les colonies présentes. Après 24 h, les colonies ont été comptées et le rapport de ce nombre de colonies au nombre de colonies présentes à $t = 0$ a été tracé en fonction du temps.

2.4. Tests de culture cellulaire

Trois types cellulaires ont été utilisés au cours de cette thèse : des fibroblastes de souris, BALB/3T3, des macrophages murins RAW 264.7 et des cellules épithéliales Madin-Darby Canine Kidney (MDCK). Les fibroblastes ont été cultivés dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) contenant 4.5 g.L⁻¹ de glucose (DMEM « High glucose ») dans lequel 10% de sérum de veau fœtal (FBS) et 1% de pénicilline-streptomycine (PS) ont été ajoutés. Les macrophages murins ont, eux, été cultivés dans un milieu DMEM contenant 4.5 g.L⁻¹ de glucose, dans lequel 5% de FBS faible endotoxine ont été ajoutés ainsi que 1% de PS. Les MDCK ont été cultivées dans un milieu DMEM contenant 1 g.L⁻¹ de glucose, dans lequel 10 % de FBS et 1 % de PS ont été ajoutés.

Les cellules ont été cultivées dans un incubateur à 37°C où l'atmosphère est enrichie à 5% de CO₂ et maintenue à 90% d'humidité relative.

2.4.1. Tests de cytotoxicité

L'activité métabolique des cellules a été évaluée grâce à un test colorimétrique avec du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT), suivant la norme ISO 10993-12. Ce sel de tétrazolium peut être réduit par une enzyme mitochondriale présente dans les cellules vivantes en formazan^{8,9}. Le formazan se présente sous la forme de cristaux violets insolubles dans le milieu de culture. Ainsi, plus il y a de cellules vivantes, plus il y aura de cristaux formés. Ces cristaux ont été dissouts dans du diméthylsulfoxyde 100% (DMSO) et l'activité métabolique a été quantifiée par une mesure d'absorbance à $\lambda = 570$ nm. Ainsi, le nombre de cellules métaboliquement actives était proportionnel à l'absorbance mesurée.

Deux tests de cytotoxicité différents ont été effectués pour les hydrogels : un test de cytotoxicité directe et un test de cytotoxicité en extrait.

2.4.1.1. Cytotoxicité directe

Le premier test effectué a été une mesure de cytotoxicité directe. Dans ce cas, 60 000 cellules dans un volume de 500 μL de milieu de culture ont été introduites dans les puits d'une plaque à 24 puits et ont été incubées pendant 24 h. Après 24 h, des hydrogels de 25 mg préalablement rincés et irradiés aux UV ($\lambda = 365 \text{ nm}$) pendant 30 min ont été placés sur les cellules dans les 500 μL de milieu et les plaques ont été incubées une nouvelle fois pendant 24 h. Des puits contrôles positif et négatif ont été également préparés. Après la première incubation des cellules pendant 24 h dans du milieu de culture, les cellules ont été incubées pendant 24 nouvelles heures dans du milieu de culture cellulaire pour le contrôle positif et dans du milieu de culture contenant 10 % de DMSO dans le milieu de culture pour le contrôle négatif.

Après ces 24 h, le MTT a été ajouté de manière à avoir une concentration en MTT finale dans les puits de 0.2 mg.mL^{-1} dans le milieu de culture, puis une nouvelle incubation de 3 h a été effectuée pour que les cellules vivantes puissent réduire le sel de tétrazolum. Enfin, les puits ont été vidés et 500 μL de DMSO ont été ajoutés afin de dissoudre les cristaux. L'absorbance à $\lambda = 570 \text{ nm}$ a été mesurée au spectrofluorimètre Xenius XC (SAFAS, Monaco). Cette absorbance peut ensuite être normalisée par rapport à un contrôle positif et un contrôle négatif d'après la formule suivante :

$$\text{Activité métabolique (\%)} = \frac{A_{\text{échantillon}} - A_{\text{contrôle négatif}}}{A_{\text{contrôle positif}} - A_{\text{contrôle négatif}}} \times 100$$

Cette mesure de cytotoxicité permet de connaître la toxicité des matériaux lorsqu'ils sont au contact direct des cellules.

2.4.1.2. Cytotoxicité en extrait

Pour le test de cytotoxicité en extrait, au lieu de placer directement les cellules sur les matériaux, des hydrogels ont été incubés pendant 24 h à 37°C dans du milieu de culture cellulaire à une concentration de 25 mg d'hydrogel pour 1 mL de milieu de culture. En parallèle, des cellules dans 100 μL de milieu (6 000 cellules par puits pour les BALB/3T3 et 1 000 cellules par puits pour les MDCK) ont été introduites dans chaque puits d'une plaque à 96 puits.

Ensuite, l'extrait (ou surnageant) a été ajouté aux cellules adhérentes dans les puits à différentes concentrations allant de 12.5 à 100% d'extrait, dilué dans du milieu de culture cellulaire. La suite du protocole est identique au protocole de cytotoxicité directe. Le MTT a été ajouté après 24 h de contact des cellules avec le milieu extrait, et après trois heures d'incubation les cristaux

de formazan ont été dissouts dans du DMSO afin de lire l'absorbance à $\lambda = 570$ nm. L'absorbance mesurée a ensuite été normalisée avec les absorbances de contrôle positif et négatif. Le contrôle positif a été représenté par l'absorbance obtenu lorsque les cellules ont été cultivées avec 100 μ L de milieu de culture cellulaire pendant 48 h et le contrôle négatif lorsque les cellules ont été cultivées pendant 24 h dans 100 μ L de milieu de culture cellulaire, puis 24 h dans 90 μ L de milieu de culture cellulaire avec 10 μ L de DMSO. L'activité métabolique des cellules en présence de nos échantillons d'hydrogels ou de peptides a été exprimée en pourcentage d'après la formule citée dans la partie 2.4.1.1.

2.4.2. Quantification du monoxyde d'azote (NO) libéré par les macrophages

Les propriétés antiinflammatoires des hydrogels et des peptides ont été étudiées par la mesure du monoxyde d'azote (NO) sécrété par les macrophages. En effet, sous l'effet d'un signal inflammatoire externe, les macrophages vont sécréter des cytokines et du NO afin d'éliminer des corps étrangers, tel qu'un implant par exemple ¹⁰. Ce NO sécrété peut être mesuré par un test d'absorbance appelé test de Griess où les ions NO_2^- présents en solution (ions en solutions provenant de la sécrétion du NO par les macrophages) réagissent avec le réactif de Griess qui est un composé diazoté (**Figure 2.4.**). Cette réaction conduit à la formation d'un diazolium ¹¹. Ce dernier peut ensuite réagir avec un second réactif, le N-naphtyl-éthylènediamine (NED), formant un composé stable violet qui absorbe à une longueur d'onde $\lambda = 540$ nm.

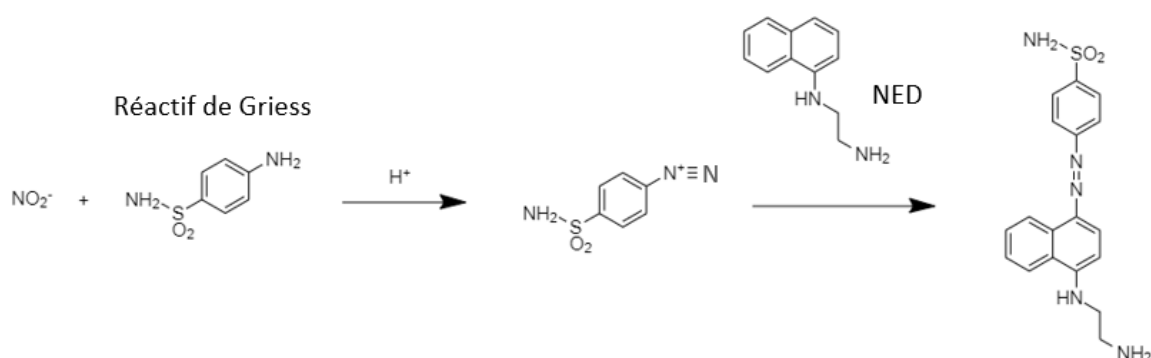


Figure 2.4. Schéma réactionnel de la réaction avec le réactif de Griess lors du dosage des ions NO_2^- formés à partir du NO sécrétés par les macrophages. Dans un premier temps, à pH acide, les ions vont réagir avec l'amine du réactif de Griess formant un diazolium. Ensuite, ce sel réagit avec le second réactif (N-naphtyl-éthylènediamine, NED) formant ainsi un composé stable absorbant à 540 nm.

Dans cette thèse, nous avons utilisé des macrophages murins RAW264.7. Ces cellules ont été cultivées dans des plaques à 24 puits pendant 24 h. Après ces 24 premières heures, les cellules ont été traitées soit avec :

- des lipopolysaccharides (LPS) d'*E. coli* à 10 ng.mL⁻¹. Le LPS permet d'induire la différenciation des macrophages en macrophages M1 pro-inflammatoires, directement impliqués dans la sécrétion de NO ;
- les échantillons à tester seuls (soit les peptides en solution, soit les hydrogels extraits dans du milieu de culture suivant le même protocole que celui décrit dans la partie 2.2.4.1.) ;
- les échantillons à tester avec ajout de LPS à 10 ng.mL⁻¹. Cette condition permet d'étudier la capacité de l'échantillon à diminuer l'effet d'un signal pro inflammatoire sur la différenciation des cellules ;
- de l'interleukine 4 (IL-4) à 10 ng.mL⁻¹, une cytokine qui favorise la différenciation des macrophages en macrophages anti-inflammatoires M2 ;
- les échantillons à tester avec ajout de IL-4 à 10 ng.mL⁻¹ qui permet de vérifier que l'échantillon ne bloque pas la différenciation des macrophages en M2 ;
- un contrôle avec les cellules cultivées uniquement dans le milieu de culture standard.

Les cellules ont ensuite été laissées dans l'incubateur pendant 24 h supplémentaires. Après ces 24 heures, 100 µL du milieu de culture contenant les différentes conditions de matériaux ou de peptides ont été introduits dans les puits d'une plaque à 96 puits. Ensuite, 100 µL de tampon acétoacétique à 0.01 M pH 2.5 ont été ajoutés, ainsi que 50 µL d'un mélange du réactif de Griess modifié (Sigma Aldrich) contenant le NED à 6 mg.mL⁻¹ dans de l'eau ultra pure de résistivité de 18 MΩ.cm. La plaque a été mise sous agitation pendant 15 min et l'absorbance a été lue à $\lambda = 540$ nm au spectrofluorimètre Xenius XC (SAFAS, Monaco).

Les absorbances résultantes sont ensuite normalisées par rapport à l'absorbance lue lors de la sécrétion de NO par les macrophages traités avec du LPS afin de voir si les échantillons favorisent ou non la différenciation des macrophages en macrophages pro inflammatoires.

2.4.3. Suivi de la migration cellulaire : modèle de cicatrisation

Afin d'étudier les propriétés de prolifération cellulaire des hydrogels, des expériences de migration cellulaire par vidéomicroscopie ont été effectuées.

Un vidéomicroscope ("Timelapse") Nikon Ti-E (France) équipé d'une caméra Andor Zyla sCMOS (Andor Technology Ltd, Royaume-Uni) a été utilisé afin de suivre dans le temps la migration cellulaire au sein du gap. Un objectif x10 et le logiciel Nikon NIS-Elements Ar ont été utilisés. Lors de l'expérience, la température a été fixée à 37°C, le pourcentage de CO₂ à 5 %

et l'humidité à 10 %. Les images des échantillons sont régulièrement acquises par une caméra et directement transmises sur l'ordinateur. La migration cellulaire au cours du temps peut donc être facilement observée et enregistrée sur plusieurs heures. Une image a été prise toutes les 20 minutes pendant 40 h. Après ces 40 h, les logiciels Ilastik et Fiji ont été utilisés afin de quantifier l'évolution de l'aire du gap au cours du temps. Le logiciel Ilastik permet de différencier informatiquement les cellules du gap sur toutes les images, puis le logiciel Fiji, en complément de programmes informatiques, permet de créer un masque noir / blanc de l'image (noir les cellules et blanc le gap), puis de compter le nombre de pixel correspondant au blanc et celui correspondant au noir. Il est ainsi possible de connaître le nombre de pixels que les cellules recouvrent et de tracer la diminution de l'aire du gap au cours du temps.

La capacité de « cicatrisation » d'un tapis de cellules a été étudiée en quantifiant la vitesse de migration des cellules au sein d'un gap entre deux tapis cellulaires. Des cellules épithéliales Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) ont été utilisées pour cette étude. Ces dernières ont étéensemencées dans des puits (μ -dish) de 35 mm de diamètre contenant un fond en verre avec à l'intérieur un insert en silicone (Ibidi, France) (**Figure 2.5.**). Les cellules ont été tout d'abordensemencées et une fois le tapis cellulaire obtenu, (soit après 24 h de culture), les inserts en silicone ont été retirés : cela crée un « gap » ou zone de déplétion dans le tapis de cellules. C'est ce gap qui sera imagé au vidéomicroscope.

Lors des expériences, de la ϵ -PLL en solution à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a été testée dans le milieu de culture pour évaluer un éventuel effet de ce biopolymère sur la cicatrisation. Des extraits d'hydrogels contenant la ϵ -PLL (même protocole que pour la cytotoxicité en extrait pour l'extraction des biomatériaux) ont été également testés.

Dans un premier temps, des hydrogels ϵ -PLL / PEGDA ont été préparés comme expliqué précédemment. Ils ont ensuite été pesés et découpés en morceaux de 50 mg, avant d'être rincés au TCEP et au Tris / NaCl. Enfin, chaque morceau de 50 mg a été extrait dans 2 mL de milieu de culture DMEM contenant 1 g.L^{-1} de glucose, 10 % de FBS et 1 % de PS (DMEM « low glucose ») pendant 24 h à 37°C . De même, de la ϵ -PLL à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dans du milieu de culture DMEM « low glucose » a été incubée pendant 24 h à 37°C . Du milieu de culture DMEM « low glucose » seul a également été incubé pendant 24 h à 37°C .

En parallèle de cela, des cellules épithéliales de rein de chien (MDCK) ont été cultivées dans du DMEM « low glucose ». Elles ont étéensemencées dans des μ -dish de 35 mm de diamètre possédant un insert en silicone en leur centre (Ibidi, Allemagne), autour et à l'intérieur de l'insert de silicone. Les μ -dish ont ensuite été fermées puis incubées à 37°C pendant 24 h jusqu'à obtenir une monocouche de cellules recouvrant tout le fond de la μ -dish. Après ces 24 h, les inserts en silicone des μ -dish ont été retirés ainsi que le milieu de culture. Les cellules

ont été rincées deux fois avec 1 mL de PBS, puis 2 mL du milieu de culture contenant l'hydrogel extrait ont été introduits. Un contrôle a également été préparé en ajoutant 2 mL de milieu de culture seul. De même, une dernière condition a été préparée en utilisant 2 mL de ϵ -PLL à $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ dans du milieu de culture DMEM « low glucose ». Enfin, 1.5 mL d'huile minérale ont été ajoutés dans chaque boîte afin de limiter l'évaporation du milieu pendant l'expérience. La vitesse de migration au sein du gap a été observée pendant 40 h.

A la fin de l'expérience, les vidéos obtenues ont été traitées avec les logiciels Ilastik et ImageJ. Le logiciel Ilastik a permis dans un premier temps de déterminer numériquement la localisation des cellules du gap sur chaque image capturée. Une fois la localisation des deux zones déterminée numériquement, le fichier a été traité avec le logiciel ImageJ. Un masque noir / blanc a été créé afin de marquer le gap en blanc et les cellules en noir. Ensuite, un programme nous a permis de quantifier le nombre de pixels noirs *versus* le nombre de pixels blancs pour chaque image. Ainsi, nous avons obtenons une quantification de la surface couverte par les cellules et la surface du gap au cours du temps. On a pu ainsi remonter au pourcentage de fermeture du gap au cours du temps en rapportant le nombre de pixels correspondant au gap à un temps t au nombre de pixels du gap au temps $t = 0$ de l'expérience.

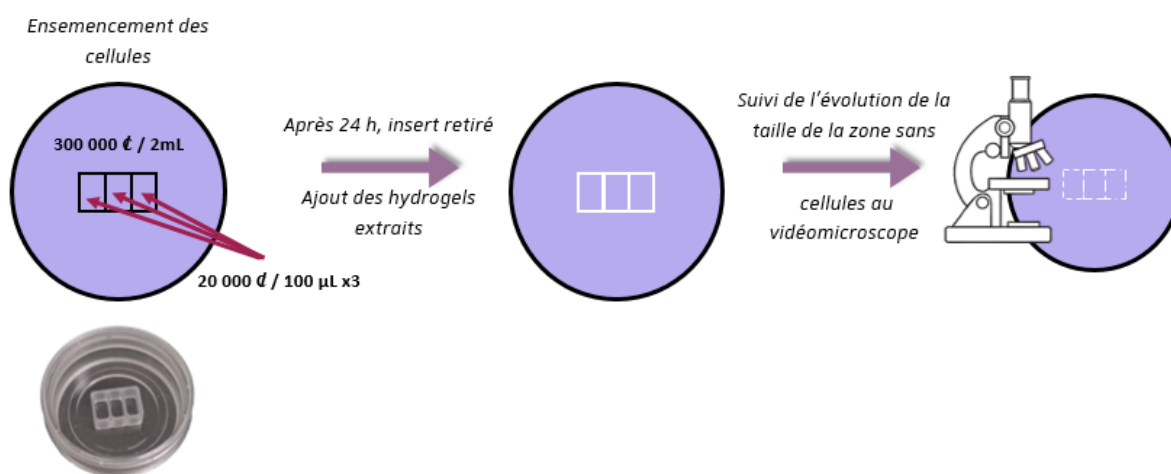


Figure 1.5. Suivi de la migration cellulaire dans des μ -dish au vidéomicroscope pour l'étude des propriétés cicatrisantes des hydrogels. Dans un premier temps, les cellules sont ensemencées dans un μ -dish. Une fois qu'une monocouche de cellules s'est formée au fond de la μ -dish, l'insert en silicone est retiré et l'élément d'étude dans du milieu de culture est ajouté sur les cellules. L'évolution de l'aire du gap au cours du temps est suivie au vidéomicroscope pendant 40 h.

2.4.4. Hémolyse des globules rouges en présence de peptides en solution

L'utilisation de biomatériaux dans un système vivant peut être source de cytotoxicité, d'où l'importance d'effectuer des tests de viabilité cellulaire des matériaux sur les cellules. Les globules rouges font partie des cellules qui peuvent être touchées par l'utilisation de

biomatériaux. Ces cellules anucléées sont détruites lorsqu'un composé est cytotoxique, ce qui libère l'hémoglobine qu'elles contiennent dans le surnageant. Ce phénomène s'appelle l'hémolyse et peut être quantifié par une mesure de l'absorbance après traitement avec un composé. Il est donc possible de déterminer le pourcentage d'hémolyse par une mesure d'absorbance du surnageant. Ainsi, l'hémolyse des globules rouges en présence de peptides en solution à différentes concentrations a été étudiée.

Pour cela, des globules rouges de mouton ont été utilisés. Ces derniers ont tout d'abord été rincés trois fois avec du PBS. Une étape de centrifugation à 2 500 rpm pendant 5 min est effectuée entre chaque rinçage afin d'éliminer les globules rouges déjà endommagés. Ensuite, les globules rouges ont été introduits dans une plaque à 96 puits à fond en U avec différentes concentrations de peptides. Des contrôles ont été préparés avec soit des globules rouges non traités dans du PBS, soit des globules rouges traités avec le détergent Triton X-100 à 0.2 % dans du PBS. La plaque a ensuite été placée dans un incubateur à 37°C pendant 30 min, puis centrifugées afin de séparer les globules rouges et le surnageant. Ce dernier a été par la suite introduit dans une plaque à 96 puits à fond plat et son absorbance est lue à $\lambda = 550$ nm au spectrofluorimètre Xenius XC (SAFAS, Monaco). Le pourcentage d'hémolyse a été déduit de l'absorbance mesurée en présence de l'échantillon ($A_{\text{échantillon}}$) et des absorbances témoins obtenues avec des globules rouges seuls ($A_{\text{globules rouges}}$) et avec ajout de Triton X-100 ($A_{\text{Triton X-100}}$) selon la formule :

$$\% \text{ hémolyse} = \frac{A_{\text{échantillon}} - A_{\text{globules rouges}}}{A_{\text{Triton X-100}} - A_{\text{globules rouges}}} \times 100$$

2.5. Microscope confocal

2.5.1. Principe de fonctionnement

Le microscope confocal est un microscope à faible profondeur de champ qui permet d'avoir une résolution meilleure que celle d'un microscope optique conventionnel à champ large et également de réaliser des reconstructions de structures 3D. Contrairement à un microscope optique à champ large, le microscope confocal possède deux diaphragmes ("pinholes") sur son trajet optique (**Figure 2.6.**)¹². Ainsi, le faisceau lumineux entrant est focalisé par un premier diaphragme. Le faisceau est réfléchi par un miroir dichroïque avant d'arriver sur l'échantillon. Les fluorophores présents dans la région touchée par le faisceau émettent de la

fluorescence avec une longueur d'onde différente de celle du faisceau incident et passer une seconde fois par le miroir dichroïque puis par un second diaphragme placé dans le plan focal du faisceau émis, se trouvant juste avant le détecteur. Ainsi, uniquement les photons émis par une petite partie de l'échantillon seront captés par le détecteur. La position des miroirs va ensuite être modifiée afin d'éclairer une autre partie de l'échantillon et ainsi de suite. L'image obtenue est donc en réalité une restitution de l'objet réel faite par l'ordinateur. Cette technique permet donc d'obtenir des reconstructions 3D de l'objet lorsque ce dernier n'est pas complètement plat.

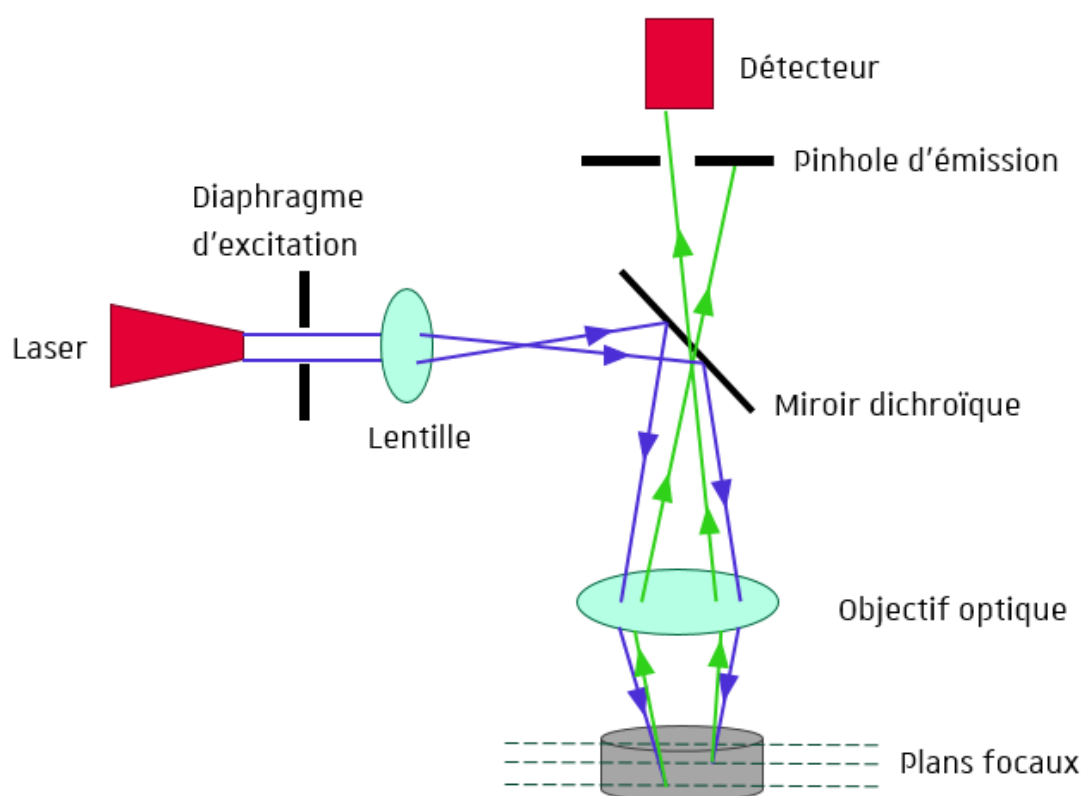


Figure 2.6. Principe de fonctionnement du microscope confocal à fluorescence.

Au cours de cette thèse, le microscope confocal inversé LSM 510 de la compagnie Zeiss a été utilisé. Il possède différentes sources lasers, notamment un laser argon avec comme longueurs d'onde d'excitation 459, 488 et 514 nm, un laser hélium néon I avec une longueur d'onde d'excitation de 543 nm et un laser hélium néon II de longueur d'onde d'excitation de 633 nm. Le traitement d'image a été effectué avec le logiciel Zeiss LSM Image Brower.

2.5.2. Marquage des bactéries à la surface de l'hydrogel

Afin de vérifier la présence de bactéries à la surface des hydrogels à la fin du test d'activité antimicrobienne, les bactéries sont marquées avec des fluorophores et sont observées par la suite au microscope confocal. Les bactéries vivantes à la surface du matériau sont marquées

avec deux fluorophores : le chlorure de 5-cyano-2,3-ditolyl de tétrazolium (CTC) et le Syto®24, provenant du kit BacLight RedoxSensor CTC Vitality Kit (ThermoFischer, France). Le CTC du kit est un fluorophore qui émet dans le rouge. Il cible les fonctions respiratoires des bactéries en précipitant dans la cellule lorsqu'il est réduit par les chaînes de transport d'électron. Le Syto®24, quant à lui, est un fluorophore qui marque les acides nucléiques et émet dans le vert.

Pour le marquage des bactéries une solution contenant du CTC à 50 mM et du Syto®24 à 0.001 mM a été préparée dans l'eau ultrapure. Lors des tests d'activité antimicrobienne, les hydrogels à tester ont été incubés pendant 24 h avec une suspension bactérienne. Le surnageant des puits a été alors éliminé et remplacé par 270 μ L de PBS + 30 μ L de solution de CTC / Syto®24. La plaque a ensuite été incubée pendant 30 min à 37°C à l'abri de la lumière. Les bactéries ont été fixées sur les matériaux avec 300 μ L de paraformaldéhyde (PFA) (Electron Microscopy Sciences, Etats-Unis) à 4% dans le PBS pendant 15 min à température ambiante. Trois rinçages successifs au PBS ont été effectués afin d'éliminer le PFA.

Pour l'observation au microscope confocal inversé, les hydrogels ont été retournés sur une lamelle de verre de manière à observer la surface qui a été le plus en contact des bactéries lors du test antimicrobien. La fluorescence du Syto®24 est observée au microscope confocal grâce à un laser à l'argon aux longueurs d'ondes $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ et la fluorescence du CTC est observée aux longueurs d'ondes $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 630 \text{ nm}$. L'objectif x63 huile est utilisé lors de ces tests.

2.5.3. Mobilité des chaînes de ϵ -PLL par FRAP

Le microscope confocal a également été utilisé pour étudier la mobilité de chaînes de ϵ -PLL dans l'hydrogel. Pour cela, des tests de Recouvrement de la Fluorescence après Photoblanchiment (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP) ont été effectués. Cette technique a été inventée par Axelrod *et al.* en 1977¹³. Le principe de cette méthode est de venir éteindre les sondes fluorescentes dans une zone précise de l'échantillon en exposant la zone à une forte dose de rayonnement laser. Une fois la fluorescence éteinte, un suivi de la fluorescence de cette zone au cours du temps est effectué. La vitesse de recouvrement de fluorescence est directement liée à la mobilité des molécules dans l'échantillon, quantifiée à la fois par le coefficient de diffusion et la proportion de molécules fluorescentes qui ne sont pas liées à l'hydrogel. Ainsi, une forte mobilité des chaînes se traduit par un recouvrement de fluorescence rapide et complet, tandis que l'absence de mobilité des chaînes est révélée par l'absence de recouvrement (**Figure 2.7.**).

Cette technique a été appliquée aux hydrogels de PEGDA et ϵ -PLL, ainsi qu'aux hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal.

Pour les hydrogels de ϵ -PLL / PEGDA, des hydrogels de 200 μ L ont été préparés au fond d'une plaque à 24 puits fond verre (comme expliqué dans la partie 2.2.1.). Cependant, ces hydrogels ont été développés en utilisant un mélange ϵ -PLL / ϵ -PLL-FITC (4 :1) à la place de la ϵ -PLL seule. Le test FRAP est effectué sans milieu dans les puits et sur les hydrogels rincés.

Pour les hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal avec ajout de FITC-PAR10-PC-SH, des hydrogels de 200 μ L ont été préparés au fond d'une plaque à 24 puits fond verre (comme expliqué dans la partie 2.2.2.). Ensuite, 500 μ L de PBS ou 500 μ L de GluC à une concentration de 10 μ g.mL⁻¹ dans du PBS ont été introduits dans les puits. Le test FRAP a été effectué une première fois juste après l'ajout des milieux au contact des hydrogels, puis une seconde fois après 24 h d'incubation des hydrogels dans les milieux à 37°C.

Le laser à argon est utilisé à 488 nm et la fluorescence émise est détectée à 520 nm. Lors de ces expériences, le temps d'exposition au laser est suffisamment long de manière à éteindre entre 40 et 70 % de la fluorescence dans la zone. Après avoir éteint la sonde fluorescente sur une zone de l'échantillon, l'intensité de la fluorescence dans la zone éteinte et dans des zones non éteinte est mesurée au cours du temps. Le fraction de chaînes immobiles est déterminé d'après la formule : $100 \times \frac{1-I(e)/100}{1-I(b)/100}$, avec $I_{(e)}$ l'intensité de la fluorescence à la fin de l'expérience et $I_{(b)}$ l'intensité de la fluorescence à la fin de l'exposition au laser à forte dose (voir **Figure 2.7**).

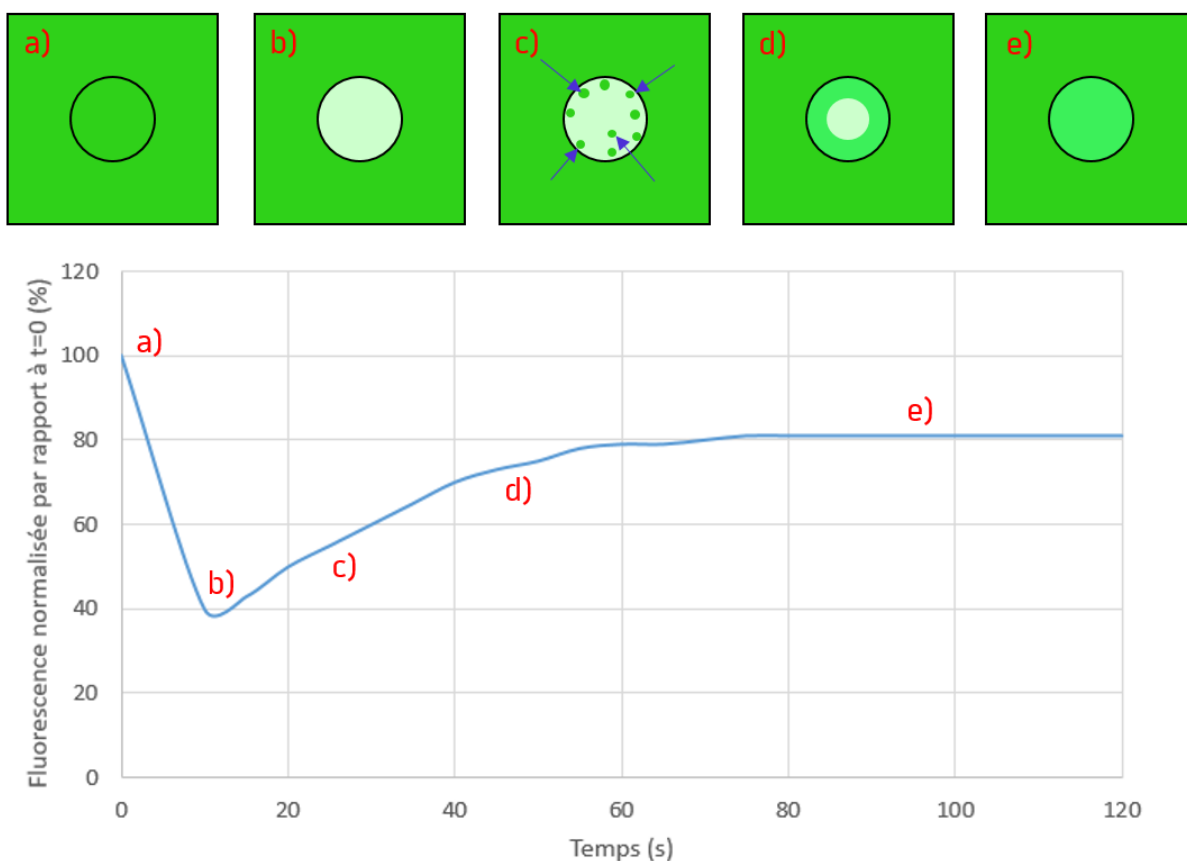


Figure 2.7. Principe de fonctionnement d'une analyse par recouvrement de la fluorescence après photoblanchiment (FRAP). La fluorescence normalisée au sein d'une zone de l'échantillon est représentée au cours du temps pour un échantillon typique présentant une mobilité de ses chaînes marquées. Le premier point ($t = 0$) correspond à la fluorescence avant photoblanchiment de la zone irradiée par laser. La zone centrale est entièrement fluorescente (a). Après photoblanchiment la zone d'intérêt a perdu entre 40 et 70 % de sa fluorescence (b). Après avoir fortement réduit la puissance du laser, le retour de la fluorescence apparaît dû à la mobilité de chaînes fluorescentes issues de la zone non photoblanchie (c). Ensuite, la zone photoblanchie par le laser retrouve de plus en plus de fluorescence car les chaînes sont mobiles et viennent restituer la fluorescence dans la zone photoblanchie (d). Enfin, après un certain temps, un palier de fluorescence apparaît et la différence entre la fluorescence de départ et celle du plateau permet de connaître la fraction de chaînes immobiles suivant la formule $100 \frac{1-I(b)/100}{1-I(e)/100}$ (e). Cette figure est un exemple bien précis. Dans les expériences réalisées lors de cette thèse, le temps d'exposition au laser est déterminé afin d'avoir une fluorescence au point (b) proche de zéro.

2.6. Rhéologie : temps de gel et module élastique

Les hydrogels possèdent des caractéristiques viscoélastiques qui peuvent être caractérisées en appliquant une contrainte mécanique sinusoïdale ¹⁴. A cet effet, les composés en solution permettant la formation de l'hydrogel sont placés entre un plan et un cône et une déformation à une fréquence unique est appliquée en continu entre le plan et le cône. Les forces appliquées afin de conserver la même déformation au cours de la réaction de gélification sont mesurées par l'appareil et permettent de remonter aux propriétés viscoélastiques du matériau.

Ces propriétés viscoélastiques se traduisent par un module élastique (G') et un module visqueux (G''). De plus l'angle de phase δ est défini par :

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'}$$

Lorsque G'' devient inférieur à G' , c'est-à-dire lorsque l'angle de phase δ devient inférieur à 45° , l'échantillon étudié passe d'un comportement visqueux (i.e. liquide) à un comportement élastique (i.e. solide). Pour un hydrogel, le temps nécessaire à cette transition est défini comme le temps de gélification : c'est le temps nécessaire pour que le réseau 3D de l'hydrogel se forme.

Les tests de rhéologie ont été effectués sur un rhéomètre Kinexus Ultra (Malvern, Royaume-Uni). Des tests à une seule fréquence ont été effectués afin d'estimer le temps de gel des matériaux, ainsi que leur module élastique. Pour cela, la fréquence a été fixée à 1 Hz et la déformation à 1% ¹⁵. Les modules élastique G' et visqueux G'' ainsi que la tangente de l'angle de phase $\tan \delta$ ont été suivis dans le temps à 45°C .

2.7. Taux de gonflement et de dégradation

Le taux de dégradation des hydrogels et leur taux de gonflement ont été étudiés afin de savoir si les matériaux sont stables ou non dans un milieu donné mais également pour connaître la quantité d'eau qu'ils sont capables d'absorber. Le taux de gonflement et le taux de dégradation des matériaux ont été mesurés par une méthode de pesées successives. Dans un premier temps, le taux d'hydratation des matériaux après gélification a été déterminé. Les hydrogels ont été pesés juste après gélification (m_{gel}), puis séchés à 37°C pendant 24 h. Une fois sec, ils

ont été pesés une seconde fois (m_{sec}). Le taux d'hydratation ($T_{hydratation}$) des matériaux synthétisés a été calculé comme étant :

$$T_{hydratation}(\%) = \frac{m_{gel} - m_{sec}}{m_{gel}} \times 100$$

Ensuite, les taux de gonflement et de dégradation ont été étudiés.

2.7.1. Mesure du taux de gonflement des hydrogels

Afin de mesurer le taux de gonflement des hydrogels, des hydrogels fraîchement gélifiés d'une masse d'environ 250 mg ont été pesés (m_{gel}) et introduits dans 2 mL de PBS. Les hydrogels ont été laissés dans le milieu pendant 24 h à 37°C. Après les 24 h, les hydrogels ont été pesés. Le taux de gonflement a été mesuré à partir de la masse des hydrogels de départ, de la masse des hydrogels hydratés et du taux d'hydratation d'après la formule suivante :

$$Taux\ de\ gonflement\ (\%) = \frac{m_{hydraté} - (m_{gel} - T_{hydratation} \times m_{gel})}{(m_{gel} - T_{hydratation} \times m_{gel})} \times 100$$

2.7.2. Mesure du taux de dégradation

Le taux de dégradation est également mesuré par pesées successives. Pour cela, des hydrogels fraîchement gélifiés d'une masse d'environ 250 mg ont été pesés et introduits dans 5 mL de PBS. Les hydrogels ont été laissés dans ce milieu pendant 24 h à 37°C. Ensuite, le PBS a été retiré et les hydrogels ont été séchés pendant 48 h à l'étuve à 37°C. Ils ont été enfin pesés à sec (m_{sec2}) puis le taux de dégradation a été mesuré en fonction de la masse de départ de l'hydrogel, de sa masse sèche m_{sec2} et du taux d'hydratation suivant la formule :

$$Taux\ de\ dégradation\ (\%) = \frac{(m_{gel} - T_{hydratation} \times m_{gel}) - m_{sec2}}{(m_{gel} - T_{hydratation} \times m_{gel})} \times 100$$

2.8. Test d'interaction peptide-LPS

Les bactéries à Gram négatif présentent sur leur membrane extérieure des lipopolysaccharides (LPS) ^{16, 17}. Il est possible d'utiliser cette propriété pour étudier les interactions entre la membrane bactérienne des bactéries Gram négatif et le peptide et ainsi mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors de l'activité antimicrobienne des peptides sur les bactéries Gram négatif.

Ces interactions ont été observées en utilisant un test de « déplacement de fluorescence ». Pour cela, la molécule de Bodipy TR-cadaverine (Bodipy) (ThermoFischer, France) a été utilisée. Cette dernière est un fluorophore qui a la capacité de se lier de manière ionique à la fraction du lipide A du LPS. Cette liaison entre le Bodipy et le LPS forme un complexe. Sous cette forme, le Bodipy n'émet plus de fluorescence, la sonde fluorescente du Bodipy est éteinte ^{18, 19}. Cependant, lorsqu'un composé, tel qu'un peptide antimicrobien, est ajouté et interagit avec le LPS (plus particulièrement avec le lipide A), le complexe formé entre le Bodipy et le LPS peut être déplacé et remplacé par un complexe peptide antimicrobien / Bodipy ; la fluorescence du Bodipy est alors retrouvée. Il est ainsi possible de déterminer l'affinité entre un peptide et le LPS par une mesure de la fluorescence réémise et ainsi d'obtenir des informations sur le mécanisme d'interaction entre le peptide et la membrane de la bactérie.

Dans un premier temps, le LPS a été préparé à $7.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dans un tampon Tris 50 mM, pH 7 (Tris). Une solution de Bodipy a été également préparée à une concentration de $2.1 \mu\text{M}$ dans le tampon Tris. Dans une plaque noire de 96 puits, 50 μL de Bodipy et 50 μL de LPS ont été introduits. La plaque a ensuite été placée sous agitation à l'abri de la lumière pendant 30 min afin de former le complexe entre le LPS et le Bodipy et d'éteindre la fluorescence. Ensuite, 100 μL de solutions de peptides à des concentrations comprises entre 5 et $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dans le tampon Tris ont été ajoutées, puis la plaque a été remise sous agitation à l'abri de la lumière pendant 15 min. Enfin, la fluorescence dans chaque puits a été mesurée au spectrofluorimètre Xenius XC (SAFAS, Monaco) avec les longueurs d'onde $\lambda_{\text{ex}} = 590 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 620 \text{ nm}$. Les valeurs de fluorescence sont ensuite normalisées par rapport à un puits contrôle contenant 50 μL de LPS, 50 μL de Bodipy et 100 μL de tampon Tris. Les courbes de la fluorescence normalisée en fonction de la concentration en peptide a été tracées.

2.9. Suivi de la libération du polypeptide clivable par la GluC

Dans la partie 5 de ce manuscrit, des hydrogels à base de PEGs fonctionnalisés avec des thiols et des maléimides sont présentés. Un polypeptide clivable par l'enzyme GluC sécrétée

par la bactérie *S. aureus* a été ajouté dans ces hydrogels en amont de la gélification. Ce peptide, décrit dans la partie 2.1.6., est constitué 1) d'une séquence antimicrobienne PAR10, 2) d'une sonde fluorescente (FITC), le tout formant la séquence FITC-PAR10, 3) d'une séquence clivable par l'enzyme GluC (TLRGGE) et 4) d'une cystéine en bout de chaîne. Ainsi, lors de la synthèse des hydrogels, le polypeptide se lie de manière covalente aux chaînes de PEGs dans le matériau par la fonction thiol de la cystéine et n'est libéré que lors du clivage par l'enzyme de la séquence clivable.

Il est possible de suivre la libération de la séquence FITC-PAR10 par fluorescence au spectrofluorimètre Xenius XC (SAFAS, Monaco). Pour cela, les hydrogels ont été préparés dans des plaques multipuits conçues par le prototypiste Karim Benmlih (Inserm UMR_S 1121). Ces plaques sont constituées de puits doubles : un grand puits est relié à un puits plus petit (**Figure 2.8.**). L'hydrogel contenant le polypeptide a été synthétisé dans le grand puits et la mesure de la fluorescence du milieu au cours du temps a été faite dans le petit puits. Cela permet de ne pas faire de mesure sur l'hydrogel mais uniquement dans le surnageant. De plus, la mesure de l'absorbance a été réalisée en continu et non pas par prélèvements successifs du surnageant. Ainsi, des hydrogels de 250 μL ont été préparés dans le grand puits. Ils ont été ensuite rincés avec 500 μL de tampon Tris / NaCl deux fois : un rinçage court d'une minute et un rinçage long d'une heure. Du PBS a été ajouté dans les puits avec ou sans enzyme dans les conditions suivantes :

- condition contrôle : 500 μL de PBS;
- 450 μL de PBS + 50 μL de GluC à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$;
- 490 μL de milieu PBS + 10 μL de trypsine 0.5 mg.mL^{-1} – EDTA 0.25 mg.mL^{-1} .

Enfin, la fluorescence du surnageant à 37°C a été lue pendant plusieurs heures à $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$. La plaque a été agitée entre chaque mesure. Une mesure de fluorescence a été effectuée toutes les deux minutes.



Figure 2.8. Plaque bi-puits conçu par Karim Benmlih utilisée pour les tests de suivi de libération du peptide par fluorescence

Bibliographie

1. J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1988, **85**, 5409-5413.
2. A. Mutschler, L. Tallet, M. Rabineau, C. Dollinger, M.-H. Metz-Boutigue, F. Schneider, B. Senger, N. E. Vrana, P. Schaaf and P. Lavalley, *Chemistry of Materials*, 2016, **28**, 8700-8709.
3. A. M. Frey, D. Chaput and L. N. Shaw, *Cell Rep*, 2021, **35**, 108930.
4. L. Tallet, Thesis Revêtement antibactérien intelligent à base de polyarginine et d'acide hyaluronique pour des applications biomédicales, Strasbourg, 2019.
5. W. Cao and C. Gao, *Polymer*, 2020, **186**, 122082.
6. J. N. Liu, S. L. Chang, P. W. Xu, M. H. Tan, B. Zhao, X. D. Wang and Q. S. Zhao, *J. Agric. Food Chem.*, 2020, **68**, 1101-1109.
7. M. H. Kollef, A. Torres, A. F. Shorr, I. Martin-Loeches and S. T. Micek, *Crit Care Med*, 2021, **49**, 169-187.
8. X. Gai, C. Liu, G. Wang, Y. Qin, C. Fan, J. Liu and Y. Shi, *Regen Biomater*, 2020, **7**, 321-329.
9. M. Ghasemi, T. Turnbull, S. Sebastian and I. Kempson, *Int J Mol Sci*, 2021, **22**.
10. E. M. Palmieri, C. McGinity, D. A. Wink and D. W. McVicar, *Metabolites*, 2020, **10**.
11. K. Yang, Y. Wu, H. Xie, M. Li, S. Ming, L. Li, M. Li, M. Wu, S. Gong and X. Huang, *Sci Rep*, 2016, **6**, 27326.
12. T. J. Fellers and M. W. Davidson, Introduction to Confocal Microscopy, <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/confocal/confocalintro/>).
13. D. Axelrod, D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson and W. W. Webb, *Biophysical Journal*, 1977, **16**, 1055-1069.
14. J. Scher, *Journal*, 2006.
15. V. Gribova, F. Boulmedais, A. Dupret-Bories, C. Calligaro, B. Senger, N. E. Vrana and P. Lavalley, *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, **12**, 19258-19267.
16. H. S. Kim, S. Kim, S. J. Shin, Y. H. Park, Y. Nam, C. W. Kim, K. W. Lee, S. M. Kim, I. D. Jung, H. D. Yang, Y. M. Park and M. Moon, *Transl Neurodegener*, 2021, **10**, 49.
17. P. H. Clarke, *Nature*, 1962, **195**, 516-517.
18. S. Harm, K. Lohner, U. Fichtinger, C. Schildbock, J. Zottl and J. Hartmann, *Int J Mol Sci*, 2019, **20**.
19. A. Giuliani, G. Pirri and A. C. Rinaldi, in *Antimicrobial Peptides Methods and Protocols*, ed. M. i. M. Biology, 2010, vol. 618.

Chapitre 3. Etude de l'influence de peptides branchés « MAP » à base d'arginines sur les propriétés antibactériennes

Chapitre 3. Etude de l'influence de peptides branchés « MAP » à base d'arginines sur les propriétés antibactériennes

3.1. Introduction	116
3.2. Les propriétés antibactériennes des peptides ramifiés « MAP » : étude <i>in vitro</i> et modélisation moléculaire	117
3.2.1. Abstract	117
3.2.2. Introduction	118
3.2.3. Materials and methods	121
3.2.3.1. Materials	121
3.2.3.2. Methods	121
3.2.4. Results	124
3.2.4.1. Antimicrobial properties of peptides	124
3.2.4.2. Biocompatibility of the peptides	128
3.2.4.3. Computational studies	131
3.2.5. Conclusion and perspectives	136
3.3. Résultats complémentaires	137
3.3.1. Préparation des revêtements pour les tests <i>in vitro</i>	140
3.3.2. Adsorption du peptide dans la multicouche PAR30 / HA	140
3.3.3. Etude de l'activité antibactérienne des multicouches sur <i>S. aureus</i>	143
3.3.4. Etude de la cytotoxicité des revêtements sur des cellules fibroblastes	145
3.4. Conclusion	146
Bibliographie	148
Figures complémentaires	151

3.1. Introduction

Les infections nosocomiales sont, par définition, des infections développées en milieu hospitalier. Elles sont un problème de santé publique et économique majeur à travers le monde puisqu'environ 1 patient sur 20 développe une infection après un séjour en centre de soins. La moitié de ces infections sont dues à l'utilisation de dispositifs médicaux, tels que les cathéters, les sondes urinaires ou encore les implants. Une infection au niveau d'un implant a pour conséquence d'augmenter les risques de rejet du biomatériau ¹. Pour limiter ces risques, une antibiothérapie est généralement prescrite. Cependant, un grand nombre de bactéries responsables des infections nosocomiales développent des mécanismes de résistances face à ces antibiotiques, en raison notamment de leur surconsommation, ce qui rend le traitement beaucoup moins efficace. C'est ce qu'on appelle l'antibiorésistance ². Ainsi, de nouvelles méthodes et de nouvelles molécules doivent être identifiées afin de diminuer le risque d'infection mais également afin de limiter la croissance des souches résistantes aux antibiotiques. Les peptides antimicrobiens sont, par exemple, des molécules d'un grand intérêt pour diminuer le risque d'infection, comme expliqué dans le chapitre 1 de cette thèse.

Parmi les peptides antimicrobiens et les homopolymères connus, la poly(L-arginine) (PAR) est très étudiée au laboratoire UMR_S 1121 depuis plusieurs années pour ses propriétés antibactériennes, que ce soit sur des bactéries à Gram positif ou à Gram négatif. La PAR a été utilisée lors de la construction de revêtements multicouches avec un polyanion, l'acide hyaluronique (HA). La construction de ces revêtements se base sur les interactions électrostatiques entre les charges positives de la PAR et celles négatives de l'HA et sera plus détaillée dans la partie 3.3. Différentes tailles de chaînes de PAR ont été utilisées afin d'étudier l'influence de cette taille sur les propriétés antibactériennes des revêtements ³. Les résultats ont montré que les revêtements formés de PAR composées de 30 arginines (PAR30) permet de diminuer la croissance bactérienne de manière plus importante que lorsque de la PAR de 10, 100 ou 200 arginines (respectivement PAR10, PAR100 et PAR200) est utilisée. Il a ensuite été prouvé que ce résultat est dû à la diffusion des chaînes dans le film multicouche. En effet, les chaînes de PAR100 et PAR200 sont moins mobiles dans le film que la PAR10 ou que la PAR30 en raison de leur taille, et ne peuvent donc pas être aussi bien libérées du revêtement. La quantité de PAR100 ou PAR200 en contact avec les bactéries n'est donc pas suffisante pour inhiber ces dernières. Par ailleurs, la PAR10 produit, lors de son association avec le HA, des films beaucoup plus fins que lorsque la PAR30 est utilisée dans la construction du revêtement. Un plus grand nombre de bicouches devra donc être construit avec la PAR10 qu'avec la PAR30 afin d'obtenir la même épaisseur de film, et obtenir ainsi des propriétés antibactériennes intéressantes.

Ainsi, la taille des chaînes de PAR est un paramètre déterminant afin de former des revêtements antibactériens efficaces. Cependant, est-ce le seul paramètre qui va influencer sur les propriétés du film, ou bien la structure de la molécule va-t-elle, elle aussi, être déterminante ? Jusqu'à présent, les chaînes de PAR utilisées étaient linéaires, mais des structures branchées (ou ramifiées) seraient-elles plus efficaces ? C'est sur la base de ce questionnement que les travaux présentés dans ce chapitre de thèse ont été effectués. Dans la partie 3.2 de ce chapitre, une étude de l'influence de la structure ramifiée des chaînes de PAR sur les propriétés antibactériennes a d'abord été réalisée en solution et est présentée sous forme d'article qui sera soumis pour publication prochainement. Ensuite, ces peptides PAR branchés ont été ajoutés en tant que dernière couche de multicouches de PAR30 linéaires et HA afin de déterminer l'impact de la structure ramifiée des chaînes de PAR sur les propriétés antibactériennes des revêtements.

3.2. Les propriétés antibactériennes des peptides ramifiés « MAP » : étude *in vitro* et modélisation moléculaire

Rédigée sous forme d'article pour une soumission prochaine

The antibacterial properties of multiple antigenic peptides: *in vitro* evaluation and molecular dynamic simulations

Eloïse Lebaudy, Florent Barbault, Yves Nominé, Bernard Senger, Jennifer Rodon Fores, Lauriane Petit, Nihal Engin Vrana, Philippe Laval

3.2.1. Abstract

The emergence of bacterial strains resistant to antibiotics is a major issue in the medical field. Antibiotics are nowadays the main way to treat infections, thus it is necessary to find new molecules to replace antibiotics against resistant strains. Antimicrobial peptides are widely studied as they do not generate as much resistant bacterial strains as antibiotics and present a broad range of activity. Among them, poly(L-arginine) presents promising antibacterial properties, especially in the perspective of its use in biomaterials. Linear poly(L-arginine) has been extensively studied but the impact of its structure remains unknown. In this study, the antibacterial properties of branched poly(L-arginine) peptides, known as multiple antigenic peptides, is evaluated. First, *in vitro* analysis of the minimal inhibitory concentration of the peptides shows that branched poly(L-arginine) is more efficient than linear poly(L-arginine) containing the same number of arginine residues. To understand this difference, the interaction between these peptides and the bacterial membrane is simulated thanks to molecular

dynamics models. It is observed that the bacterial membrane is more distorted by the branched structure than by the linear one. This mechanism of action is in agreement with *in vitro* results and with literature.

3.2.2. Introduction

Health-care associated infections (HAIs) are a major issue in the medical field. Indeed, according to Centers for Disease Control and Prevention (CDC), each year in the USA, 3 % of patients develops nosocomial infections ⁴. These infections are responsible for 72 000 deaths per year in the USA ⁵. To decrease the risk of infections, antibiotics are delivered to patients. Today, the use of antibiotics is the major way to prevent and to fight against bacterial infections. However, in the last decades, some limitations to their use have appeared. Some strains of bacteria developed resistance to antibiotics and in 2019 a study on 25 countries and territories showed that methicillin-resistant *S. aureus* represent about 12% of the *S. aureus* strain and antibiotic resistant *E. coli* is about 36% of the *E. coli* strain ⁶. The CDC estimate that infections associated with multi-antibiotic resistant bacteria caused more than 29 000 deaths in 2020 ⁴. Thus, antibiotics are no longer effective on some strains that are more and more resistant to them ⁷. Thus, finding new strategies and new molecules to prevent bacteria mutation into resistant strains is very important for the medical field. Different strategies to decrease the use of antibiotics are studied such as dynamic therapies and the design of new antimicrobial candidates ⁸.

Antimicrobial peptides (AMPs) are, for example, a class of molecules studied to replace or decrease the use of antibiotics. AMPs are natural small molecules from the innate immunity. Their role is to fight against first microbial invasion ⁹. These peptides are most of the time cationic and amphipathic and present a broad spectrum of antimicrobial properties, namely antibacterial, antifungal and antiviral activities ^{10, 11}. A lot of studies detailed that the antibacterial activity of AMPs was due to the interaction between positive charges of the AMPs and negative charges of the outer membranes of bacteria. Indeed, due to these electrostatic interactions, the polycation can be adsorbed to the bacterial membrane. Then, other interactions such as hydrophobic interactions lead to the deformation of the membrane and the formation of pores ¹²⁻¹⁴.

Among AMPs, antimicrobial peptides with branched globular structures around a core, also called dendrimers, are highly studied to fight against multidrug resistant bacteria ¹⁵⁻¹⁷. For example, Siriwardena *et al.* showed the strong antimicrobial properties of an AMP dendrimer due to its higher density of functional groups in interaction with the surface of the bacteria ¹⁷. Besides, AMP dendrimers present a 3D structure which seems to favor the access of all the functions of the molecules to the bacterial membrane. Thus, these molecules can be effective

for bacterial inhibition and other properties can be matched to focus on several applications, such as biofilm prevention, cancer treatment, intracellular delivery, cell transfection, etc. by adding active molecules on the branched structure ¹⁸⁻²⁰. Moreover, the use of dendrimeric structures enables the optimization of their stability by avoiding their degradation by protease for instance, leading to better antimicrobial activity ²¹.

We demonstrated recently that homopolypeptides as polycations are a promising tool to fight against bacteria and can be used to design antimicrobial coatings ²². These polymers are positively charged, enabling them to interact with and destabilize negatively charged bacterial membranes. Finally, these polycations can be associated to a negatively charged polymer to develop a coating with longer release of antibacterial properties ³. In these studies, strong antibacterial properties were conferred to the coatings by the use of a linear homopolypeptide, poly(L-arginine) (PAR). By using only PAR associated with hyaluronic acid in a layer-by-layer buildup process, a thin coating can be produced on all surfaces. This leads to a “multilayer” film with the ability to prevent colonization by any kind of bacteria. Moreover, we showed that the size of the PAR chain (number of arginine residues per chain) play a key role on the antibacterial properties of the coating ²³. Indeed, the antibacterial properties are related to the diffusion of the PAR chains inside the multilayer of polyelectrolytes. This mobility determines their ability to be available on surface and to adsorb on the membrane of the incoming bacteria. Finally, small chains can better diffuse inside the film compared to longer one. However, too small chains produce thinner films. Thus the antimicrobial activity of the coating is based on a tradeoff between mobility of the PAR chains and their ability to produce thick films. The results show that the PAR with 10-50 residues is the optimal chain length range to design efficient coatings.

From these results, the next question is if the size of the PAR chains is the unique parameter tuning the antibacterial properties or if the 3D structure of the PAR can also influence the antimicrobial properties of this molecule. For example, peptide dendrimers are interesting structures and some of them have been described to possess strong antibacterial activities. Thus, we decided to study multiple antigenic peptides (MAPs) of arginine amino acids. MAPs are synthetic branched peptides that can be compared to dendrimers because of their structure. MAPs were already studied for various applications such as diagnostics, antiviral and vaccines strategies but there were only few studies on their antibacterial properties ²⁴⁻²⁷. Indeed, MAPs are based on a lysine tree structure which provides the core of the dendrimer structure. In some applications, these structures have shown to improve the immunogenic response and they can also improve the diagnosis performance ²⁷. Finally, they can be easily tuned and functionalized with various amino acid sequences. In the present study, we designed MAPs based on arginine residues with a lysine core. As lysine possesses two amine groups,

two amino acids can be attached to one lysine on the amine groups. In this way, multibranched molecules can be designed through relative simple peptidic synthesis routes. It is then possible to develop MAPs with different numbers of arms depending on the number of lysine residues used in the core. Thereby we can obtain molecules comprising only arginine in the arms but distinguished by their configurations, as presented in **Figure 3.1.** For the nomenclature, the peptide composed of 4 arms with 5 or 8 arginine residues per arm was named respectively R5MAP4 and R8MAP4 (**Figure 3.1.B**) and the peptide composed of 8 arms with 5 or 8 arginine residues in each arm was named respectively R5MAP8 and R8MAP8 (**Figure 3.1.C**). A cyclic peptide containing 10 arginine residues was also produced (cyclo (R10)). The linear peptide composed of 20 arginine residues was called R20 (**Figure 3.1.A**). R20 was chosen instead of PAR30 in order to compare the R5MAP4 with a linear peptide containing the same number of arginine residues.

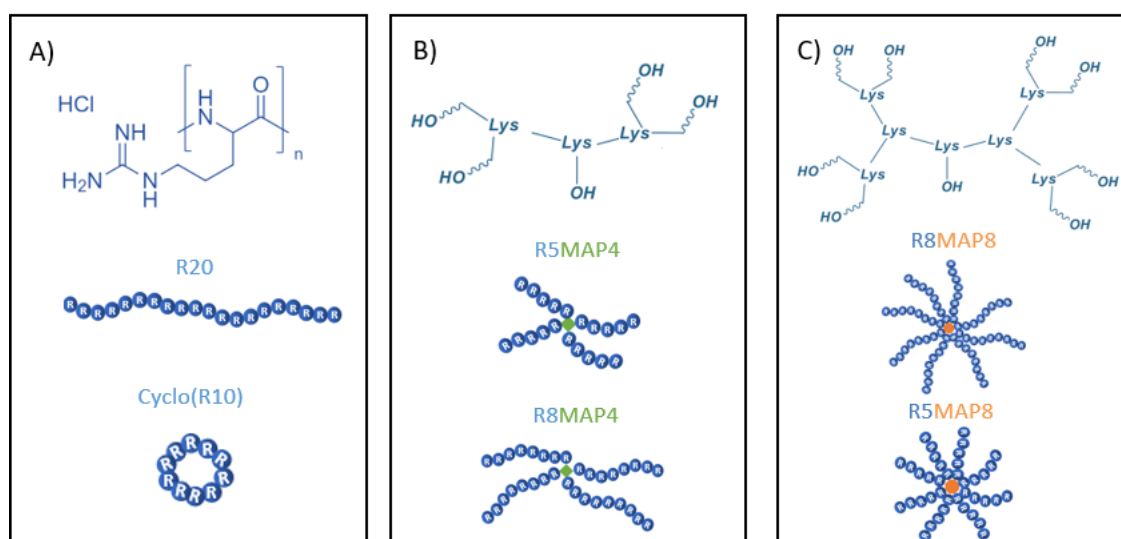


Figure 3.1. Chemical developed formula and schemes of various polyarginine peptidic structures: linear and cyclo poly (L-arginine) peptides (A), 4-arm Multiple Antigenic Peptides (MAP4) (B), 8-arm Multiple Antigenic Peptides (MAP8) (C).

In this study we evaluated antimicrobial activities of these MAPs towards Gram positive and Gram negative bacteria and we compared these activities with that of a linear PAR composed of 20 arginine residues (R20). Biocompatibility, pro- or anti-inflammatory properties were also evaluated. Then, to better understand the experimental results obtained and the mechanism involved, molecular simulation was performed which monitors the interactions between the different peptides and the bacterial membrane.

3.2.3. Materials and methods

3.2.3.1. Materials

R5MAP4, R8MAP4, R5MAP8, R8MAP8, Cylco(R10) and R20 were purchased from Pepmic (China). BodipyTM TR-cadaverine (5-(((4-(4,4-Difluoro-5-(2-Thienyl)-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene-3-yl)phenoxy)acetyl)amino)pentylamine, Hydrochloride) and thiazolyl blue tetrazolium bromide were purchased from ThermoFischer Scientific (USA). Griess reagent, Trizma hydrochloride, Fetal bovine serum, DMSO and lipopolysaccharides from *E. coli* O111:B4 (LPS) were purchased from Merck (USA). *S. aureus* ATCC25923 and *P. aeruginosa* ATCC27853 were used for bacteria tests. DMEM high glucose was purchased from Dutscher (France). Penicillin-streptomycin was purchased from Biowest (France).

3.2.3.2. Methods

3.2.3.2.1. Minimal Inhibitory Concentration evaluation

Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was tested on two bacteria strains: *S. aureus* ATCC25923, Gram positive bacteria and *P. aeruginosa* ATCC27853 Gram negative bacteria. To evaluate the MIC of the peptides, the samples were dissolved in milliQ water at concentrations between 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 2 mg.mL^{-1} . A bacterial suspension was prepared at a concentration of 8×10^5 CFU.mL⁻¹ in Mueller-Hinton Broth (MHB). Then, 90 μL of bacterial suspension were added in each well of a 96-well plate and 10 μL of peptides at the different concentrations were added to the bacteria. Three control wells were also prepared by adding 10 μL of antibiotics for negative control or of milliQ water for positive control to the 90 μL of bacterial suspension. Three wells were prepared for each condition. Finally, the plate was incubated for 24 h at 37°C and the optical density (OD) was measured at 595 nm. The OD of each condition was normalized with respect to the control.

The MIC was evaluated a minimum of three times for each peptide and bacteria strain. Then, the average value for each concentration and the standard deviation were calculated. Sigma plot software was used to plot the normalized bacterial growth (%) as a function of the concentration of peptides and the MIC was determined as the minimal concentration to inhibit 99.9 % of bacteria.

3.2.3.2.2. Kinetics of bacteria kill

To see in details how fast the peptide is to kill the bacteria, the number of bacteria in contact with the peptide was followed in time. First, a bacterial suspension was prepared at a concentration of 8×10^5 CFU.mL⁻¹ in MHB. In falcons, 9.9 mL of bacterial suspension were placed. Then, 100 μL of peptide dissolved in milliQ water were added to the bacteria. In this way, the final concentration of the peptide was the MIC evaluated previously. As the MIC in

mass was much higher for R8MAP8 than the MIC for R5MAP4 and R20, a second concentration (MIC of R5MAP4) was tested. A control falcon was also prepared by adding 100 μL of milliQ water to 9.9 mL of bacterial suspension. The falcons were incubated at 37°C for 8 h.

At $t = 0, 1, 2, 4, 6$ and 8 h, 10 μL of each tube were picked and diluted (from 100 to 10 000 times). 100 μL of each dilution were placed on agars and spread and then incubated at 37°C for 24 h. After 24 h, the colonies on agars were counted.

3.2.3.2.3. *Fluorescent displacement assay*

The interactions between peptides and LPS, which is the major component of Gram negative outer membrane can be observed using Bodipy TR-cadaverine fluorescent dye (Bodipy). The protocol was adapted from Harm *et al.* ²⁸. First, LPS at a concentration of 7.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ in Tris 50 mM pH 7 buffer (Tris), Bodipy at 2.1 μM in Tris and peptides at concentrations between 5 and 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ in Tris were prepared. Then, in a black 96-well plate, 50 μL of LPS and 50 μL of Bodipy were added and placed under stirring in the dark for 30 minutes. Then, 100 μL of peptides at the different concentrations were added to the LPS and Bodipy and placed under stirring in dark for 15 minutes. The fluorescence was then measured using a Varioskan spectrophotometer (ThermoFischer, USA) at an excitation wavelength of 590 nm and emission wavelength of 620 nm.

3.2.3.2.4. *Cytotoxicity on fibroblasts and macrophages*

The cytotoxicity of peptides in solution was tested by measuring the metabolic activity of RAW 264.7 macrophage and of BALB/3T3 fibroblast cells by a MTT assay. The experiment was performed following standard ISO 10993-5 norm. In a 96-well plate, 50 000 cells were seeded with DMEM High Glucose with the addition of 5 % low endotoxin serum and 1% PS (DMEM) and incubated for 24 h at 37°C. After 24 h, the medium was removed and replaced with peptide dissolved and diluted in DMEM at concentrations between 0.5 and 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Three wells were prepared for each concentration. The cells were incubated 24 h at 37°C with peptides. The medium was then replaced by MTT at 0.2 mg.mL^{-1} in DMEM and incubated for 3 h. Finally, the formazan crystals were dissolved in 100 μL of DMSO. The absorbance at 570 nm in each well was measured using a Varioskan spectrophotometer (ThermoFischer, USA).

3.2.3.2.5. *Nitric Oxide (NO) quantification with Griess reagent*

The anti-inflammatory activities of the R5MAP4 and R20 peptides were evaluated on macrophages by quantifying the nitric oxide (NO) released from them. First, 50 000 RAW 264.7 cells were seeded with DMEM and incubated for 24 h at 37°C. Then, peptides at a concentration of 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ were prepared in DMEM and added to the wells for 24 h. For the control, LPS and IL-4 were used at 10 ng.mL^{-1} in medium. Thus, controls with only LPS or only

IL-4 were prepared. Samples with peptides with LPS or peptides with of IL-4 were also studied. Three wells were prepared for each condition. We also prepared three wells with cell culture medium only, and three wells with the addition of DMSO to the medium. After 24 h, 100 μ L of each well were placed in another 96-well plate. Then, 100 μ L of acetoacetic 0.01 M pH 2.5 buffer and 50 μ L of Griess reagent at 6 mg.mL⁻¹ were added. The plate was placed under agitation for 5 minutes and the absorbance at 540 nm was measured using a Xenius XC spectrophotometer (SAFAS, Monaco). The absorbance was then normalized with the absorbance of LPS samples.

3.2.3.2.6. Hemolysis

The hemolysis of red blood cells in contact with peptides was also quantified. For this experiment, red blood cells from sheep were washed three times in PBS. 10 mL of red blood cells were placed in two falcons and 30 mL of PBS were added in each. The cells were centrifuged 5 minutes at 2500 rpm. Then, the supernatant was removed and replaced by 30 mL of fresh PBS and these two first steps were repeated twice. After the washing steps, the red blood cells were diluted in 10 mL of PBS. In a U bottom 96-well plate, 100 μ L of red blood cells were poured. Then, 100 μ L of peptides at concentrations from 0.6 to 60 μ M in PBS were added. For controls, 100 μ L of PBS or 100 μ L of Triton at 0.2% in PBS were added to 100 μ L of red blood cells. Three wells were prepared for each concentration. The plate was incubated at 37°C for 30 minutes and then centrifuged. 100 μ L of the supernatant of each well was poured in a 96-well plate and the absorbance of the supernatant was measured at 550 nm using Xenius XC spectrophotometer (SAFAS, Monaco).

3.2.3.2.7. Statistical analysis

MIC experiments were performed at least three times and the One-Way ANOVA statistical test was performed to reveal significant differences between peptides.

3.2.3.2.8. Molecular dynamics simulations

Molecular modeling was conducted with the GPU version of Amber 20 software package ²⁹. To generate branched peptides, slight modifications of the lysine residue were made and their partial atomic charges were determined through the semi-empirical QM computations AM1-BCC ³⁰. All molecular dynamics (MD) simulations were conducted in water boxes under NTP conditions and used the protein force-field ff14SB in conjunction with gaff2 for the modified lysine residues. When membrane systems were considered the lipid21 force-field were added to the systems ³¹⁻³⁴. Bacterial membranes were created for *Pseudomonas aeruginosa* (PA) and *Staphylococcus aureus* (SA) through the CHARMM-GUI interface ³⁵. A lipid ratio of 23% 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DPPE), 46% of 1,2-dioleoyl-snglycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) and 31% of 1,2-dipalmitoyl-sn-

glycero-3-phosphoglycerol (DPPG) was generated for PA while a ratio of 70% of 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) and 30% of 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol) (DOPG) was chosen for SA ^{36, 37}. Molecular schemes of these lipids are displayed in **Figure S3.1**.

The protocol of MD simulations starts with a first minimization of the system followed by a heating phase to reach the desired temperature of 300K. For peptides alone in water, trajectories of 40 ns were generated and repeated 4 times (replicas). Both membrane systems were firstly equilibrated alone in water through 1.2 μ s of MD. Six peptide/membrane complexes were constructed by placing either the R20, R5MAP4 or R8MAP8 peptides above PA and SA equilibrated membrane surfaces at a distance of about 50 Å authorizing the peptides to freely rotate or reorganize before making adsorption on membranes. MD were then realized for these systems for 1.2 μ s for each system. 4 replicas were generated to provide meaningful statistical analyses which were performed with the cpptraj module of Amber ³⁸. All structural visualization and images were created with the VMD software ³⁹.

3.2.4. Results

3.2.4.1. Antimicrobial properties of peptides

3.2.4.1.1. Minimal inhibitory concentrations (MIC)

The minimal inhibitory concentrations (MIC) of peptides in solution on both Gram positive *S. aureus* and Gram negative *P. aeruginosa* bacteria, two of the main bacteria responsible for nosocomial infections, are shown on **Figure 3.2**. First, one cyclo arginine and four MAPs were compared to a linear PAR. Preliminary results showed that the cyclo(R10) did not present any antibacterial activity on both *S. aureus* and *P. aeruginosa*. Besides, R8MAP4 and R5MAP4 have lower antibacterial activity compared to R5MAP8 or R8MAP8.

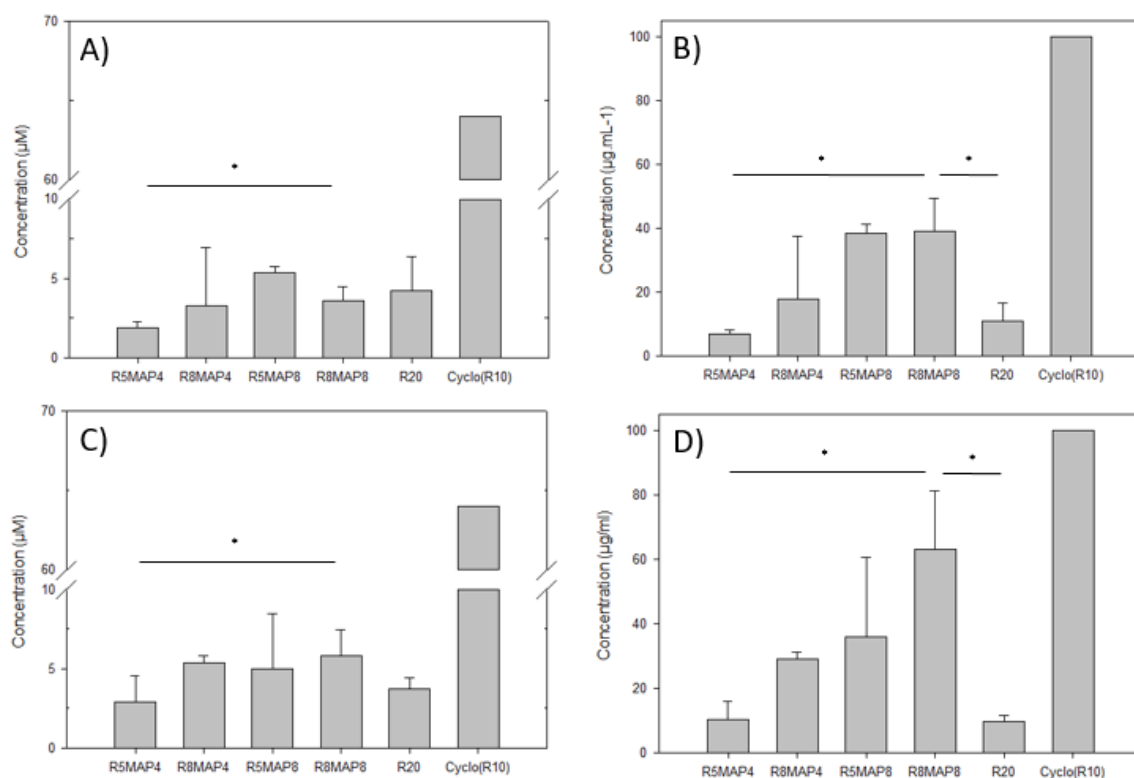


Figure 3.2. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of R5MAP4, R8MAP4, R5MAP8, R8MAP8, R20 and Cyclo(R10) poly(L-arginine) peptides in solution with *S. aureus* ATCC25923 in μM (A), *S. aureus* ATCC25923 in $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (B), *P. aeruginosa* ATCC27853 in μM (C) and *P. aeruginosa* ATCC27853 in $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (D). The MIC determination was measured in three wells, and the experiment was repeated 3 times in an independent way. The MIC was calculated as the concentration to inhibit 99.9% of the bacteria. The graphs show averages of the three experiments with error bars representing the standard error of the mean. * $p < 0.05$.

Thus, for all the further experiments we will focus on two MAPs, the smaller one and most effective, and the larger one, *i.e.*: R5MAP4 and R8MAP8, respectively. We will compare the results with a linear PAR composed of 20 arginine residues (R20). R5MAP4 presented the smallest MIC on *S. aureus* with a value of $1.9 \pm 0.4 \mu\text{M}$ (or $6.8 \pm 1.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Besides, the MIC on *S. aureus* of the linear homopolypeptide R20 was higher ($4.3 \pm 2.1 \mu\text{M}$ (or $11 \pm 6 \mu\text{g.mL}^{-1}$)) and the MIC of R8MAP8 on *S. aureus* was $3.6 \pm 0.9 \mu\text{M}$ (or $49 \pm 27 \mu\text{g.mL}^{-1}$). This suggests that for an equal number of arginine residues (20), a branched configuration of polyarginine is more effective to inhibit the growth of *S. aureus* than the linear one. However, in an unexpected way, increasing the number (from 4 to 8) and length of arms (from 5 to 8) of MAPs leads to a decrease in the antimicrobial activity of the chains. On *P. aeruginosa*, the MIC of R8MAP8 ($5.8 \pm 1.7 \mu\text{M}$ or $63 \pm 18 \mu\text{g.mL}^{-1}$) was much higher than the MIC of R20 and R5MAP4. In contrast, R20 ($3.7 \pm 0.6 \mu\text{M}$ or $9.6 \pm 1.9 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and R5MAP4 ($2.9 \pm 1.7 \mu\text{M}$ or $11 \pm 6 \mu\text{g.mL}^{-1}$) showed roughly the same value. Thus, the MIC in mass of R8MAP8 on *P. aeruginosa* was 6 times higher than the MIC of R5MAP4 or R20. We did not expect such a

result. Initially, we assumed that the key parameter in the activity is the primary sequence, *i.e.* the number of positive charges that increases with the number of arginine residues on the chain, leading to more interactions between the PAR and the bacterial membrane. R8MAP8 is composed of 64 arginine residues and R20 and R5MAP4 of only 20 arginine residues. Thus, we expected that R8MAP8 would have the best antimicrobial properties with the smallest MIC due to its high number of positive charges. However, the highest MIC and thus the lowest activity is observed for the R8MAP8 peptide. We can make the assumption that the structure of R8MAP8 has strong steric hindrance or that there is charge repulsion within the peptide. Thus, all the charges are probably not in close vicinity to the bacterial membrane. R5MAP4 with a lower number of arms and shorter ones is probably less affected by steric hindrance. Molecular simulations will be performed in the second part of this study to have a better view of the conformation of the different peptides and to confirm this hypothesis.

3.2.4.1.2. Kinetics of bacteria lysis

Further experiments were performed to refine the difference in antibacterial activities of the three most efficient peptides, R20, R5MAP4 and R8MAP8. We first evaluated the kinetics of *S. aureus* lysis by monitoring the evolution of the number of bacteria over time for the first 8 h of culture (time-kill curves). Living colonies were counted after seeding on agar plates. **Figure 3.3.** shows the results for the three peptides incubated at a concentration of 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for R20, R5MAP4 and at 10 and 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for R8MAP8. Data were normalized by using as control (100%) the number of colonies without any peptide. First, we observed that the number of colonies over time decreased and reached zero after 8 h for R20 and R5MAP4. This decrease was expected, as 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ corresponds to the MIC. However, the profile of decrease was not similar for R20 and R5MAP4. Indeed, the decrease in colonies was about 70% after one h in culture with R5MAP4. However, with R20, the number of bacteria increased up to 120% during two h at the beginning of the experiment and then decreased in the same manner than R5MAP4 after 4 h, before reaching slowly zero after 8 h. The kinetics of bacteria lysis with R5MAP4 is the fastest. Besides, the number of colonies over time for R8MAP8 at 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ first decreases but after 6 h, an increase of the number of colonies is noticed. This increase was expected as the MIC is much higher than 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for R8MAP8. Indeed, peptides probably stays in contact with the bacterial membrane after lysis so it becomes less and less available under time.

Thus, all of these results suggest that the activity of peptides, at a similar concentration of 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, is stronger for R5MAP4 than for R20 or R8MAP8. A second concentration for R8MAP8 of 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ was studied, to be close to the MIC value of this peptide. A faster decrease in the number of colonies was observed for R8MAP8 at 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ compared to

10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ with about 100% of decrease after 1 h of incubation, which shows that the increase noticed at 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ is clearly due to the low concentration of R8MAP8.

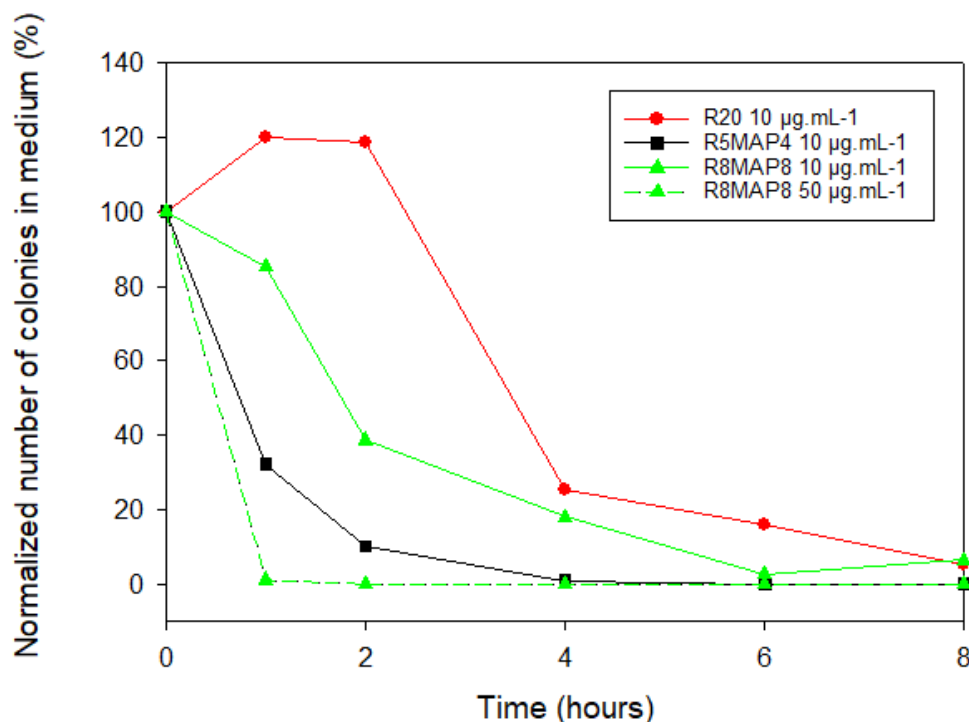


Figure 3.3. Evolution of the number of colonies of *S. aureus* ATCC25923 as a function of time during incubation with R20, R5MAP4 and R8MAP8 peptides. The kinetics of bacteria lysis was tested at 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for R20 and R5MAP4 peptides and at 10 and 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for the R8MAP8 peptide. The number of bacteria colonies was counted on agar plates after 24 h of culture. Two agars plates were prepared and counted for all conditions at each different time. The results were normalized by the number of bacteria added to the medium at the beginning of the experiment.

3.2.4.1.3. Interaction between peptides and LPS from bacterial membrane

To better understand the peptide antimicrobial mechanism, the interaction between LPS (lipopolysaccharide), which is a molecule of the outer bacterial membrane (mainly Gram negative), and R20, R5MAP4 and R8MAP8 peptides at different concentrations has been studied using a fluorescent displacement assay (**Figure 3.4.**). For this experiment, Bodipy TR-cadaverine fluorescent dye was used. This dye binds to LPS leading to fluorescence quenching. Then, the peptides were added to the LPS / Bodipy TR-cadaverine mixture. The interactions between the peptides and the LPS were quantified by measuring the fluorescence recovery of the Bodipy TR-cadaverine. As depicted in **Figure 3.4.**, we observed a fluorescence increase with the addition of all peptides even at 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. This means that the three peptides are able to make strong interactions with LPS. For concentrations higher than 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, we reached a plateau for the three peptides and no significant difference was observed in fluorescence between them, indicating that they were bound to the LPS in the same manner.

These interactions were expected according to the literature ⁴⁰. Indeed, cationic peptides and polymers can bind to the bacterial membranes due to electrostatic interactions between their positive charges and the negative charges of the bacterial membranes, and in particular due to the presence of negatively charged LPS chains in the membranes.

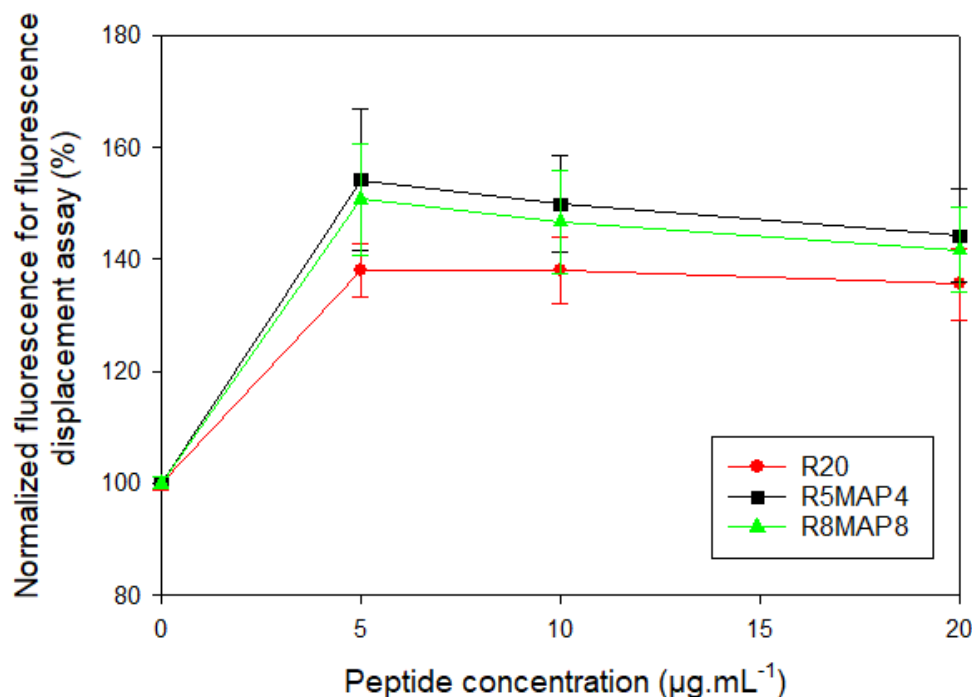


Figure 3.4. Interactions between LPS from bacterial membrane of *E. coli* and R20, R5MAP4 and R8MAP8 peptides using fluorescent displacement assay. The Bodipy TR-cadaverine fluorescent dye was quenched by the LPS. The fluorescence increase is directly related to the interaction between LPS and peptides once the peptide was added ($t = 0$). The results were normalized with the fluorescence in the absence of peptide in the solutions. All conditions were tested independently three times. The results show the averages of these three experiments and the error bars represent standard error of the mean.

3.2.4.2. Biocompatibility of the peptides

3.2.4.2.1. Cytotoxicity

We then determined the cytotoxicity of peptides in solution on BALB/3T3 fibroblast cells and on RAW 264.7 macrophage cells by quantifying the metabolic activity of cells with MTT assay when cells are incubated for 24h with peptides at various concentrations. The results on fibroblasts were presented in **Figure 3.5.A**. R20 and R5MAP4 were non cytotoxic on fibroblasts even at 100 µg.mL⁻¹ whereas R8MAP8 showed cytotoxicity at concentrations equal or higher than 50 µg.mL⁻¹, which is also the MIC of the peptide on *S. aureus* and *P. aeruginosa*. Due to this result, the use of this R8MAP8 peptide for medical applications can be problematic. Cytotoxicity on macrophage cells was also tested to evaluate a potential role of peptides on the inflammation process (pro- or anti-inflammatory properties) (**Figure 3.5.B**). We observed

that R5MAP4, R20 and R8MAP8 showed no cytotoxicity on macrophages up to 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The metabolic activity of macrophages cells was higher than 70% which is the critical value below which the standard ISO 10993-5 considers the compound cytotoxic. Finally, as the MIC of R5MAP4 and R20 were smaller than 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ as presented in **Figure 3.2.**, the ratio between the cytotoxic concentrations (for both fibroblasts or macrophages) and the MIC values are at least about 10 which is excellent. The peptides could be efficient to prevent or fight against infections without being toxic for eukaryotic cells.

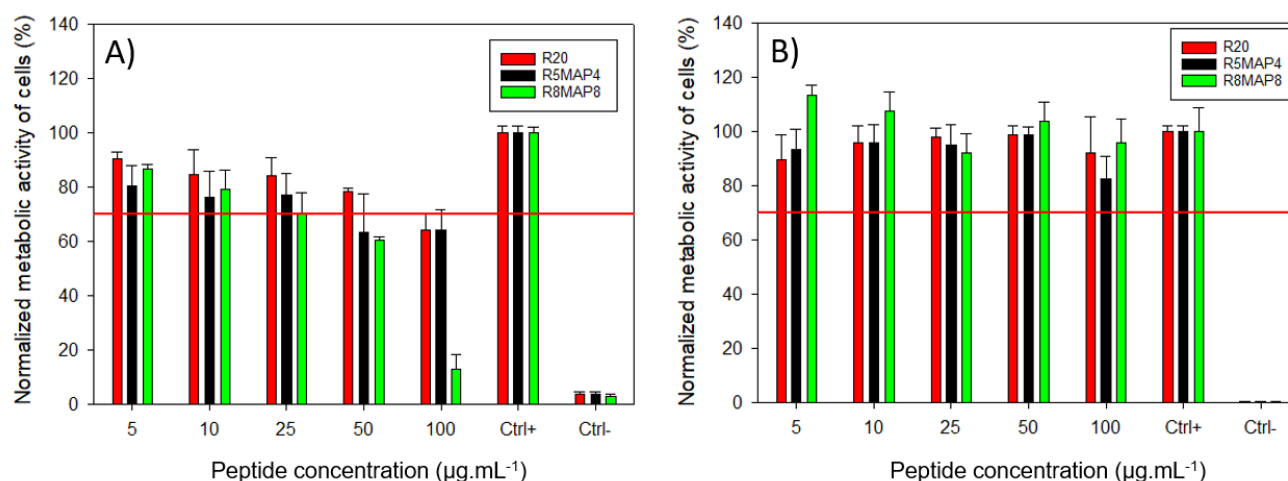


Figure 3.5. Normalized metabolic activity of BALB/3T3 fibroblasts (A) and RAW264.7 macrophages (B) with different concentrations of the R20, R5MAP4 and R8MAP8 peptides. The results were normalized with a control using cells in cell culture medium only (without peptides). The red line corresponds to the metabolic activity equal to 70%, which is the determined minimal metabolic activity to consider a material non-cytotoxic regarding the ISO10993-5 norm. The results present averages over 3 experiments with the error bars representing the corresponding standard errors of the mean.

3.2.4.2.2. NO quantification

After demonstrating that the peptides are not cytotoxic on RAW 264.7 macrophages, the NO released by these cells was quantified. NO is known to be released only when macrophages were polarized into M1 pro-inflammatory macrophages. Thus, if the peptides induce an increase in the NO secretion, it means that they could promote the inflammation process. First, addition of R20 (**Figure 3.6.A.**), R5MAP4 (**Figure 3.6.B.**) or R8MAP8 (**Figure 3.6.C**) to the medium did not significantly increase the NO secretion compared to the control with culture medium only. As expected, stimulation of macrophages with LPS strongly increases the NO level by inducing a pro-inflammatory response. When the peptide R5MAP4 was added to the medium in the presence of LPS, a slight decrease of the NO level was observed compared to the control with only LPS. However, for the medium containing the peptides R8MAP8 or R20 added to LPS, a large and significant decrease of the NO released was noted compared to the control with only LPS. This result suggests that R20 and R8MAP8 have anti-inflammatory

properties. The anti-inflammatory property of polyarginine with 30 residues (R30) was already described^{41, 42}. Thus, these results are in agreement with previous results.

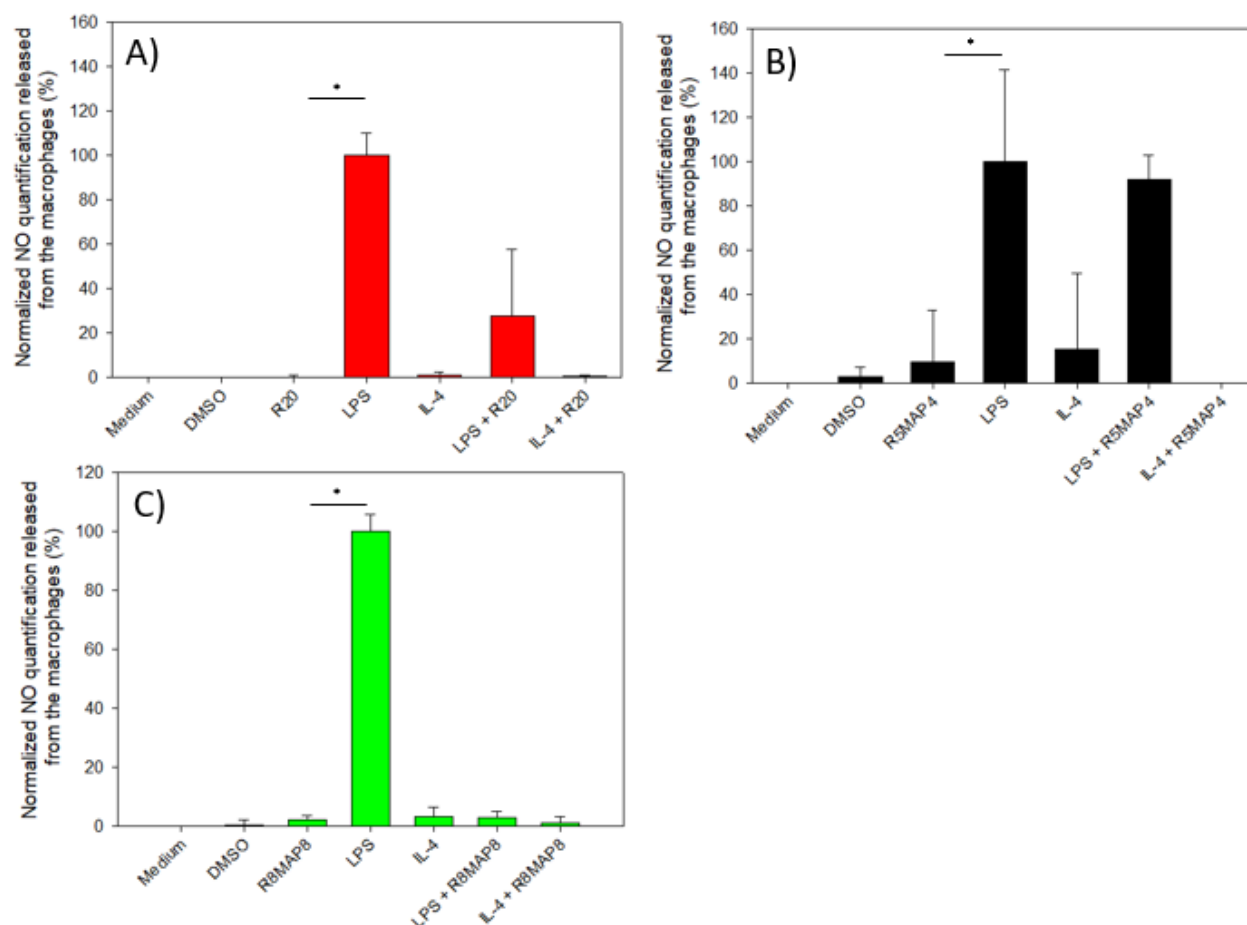


Figure 3.6. Quantification of the NO secretion from RAW2674.7 macrophage cells in contact with the R20 (A), R5MAP4 (B) and R8MAP8 (C) peptides. The results were normalized with the NO quantity secreted by the cells in LPS enriched cell medium. For the three experiments, different controls were considered: one with cells in cell culture medium, one with cells in DMSO enriched medium as a control to see the NO secreted by dead cells, other with LPS or IL-4 enriched medium. Moreover, the NO secreted by cells after 24 h of treatment with the different peptides and with a combination of the peptides with LPS / IL-4 was quantified. Three independent experiments were performed, with three values measured in each experiment. The graph represent averages and error bars represent standard error of the mean. * $p < 0.05$.

3.2.4.2.3. Non hemolytic properties

The influence of the MAP peptides on red blood cells and on their hemolysis was evaluated as another biocompatibility test. The results are depicted in **Figure 3.7**. R8MAP8 shows higher hemolytic properties than R5MAP4 or R20. Indeed, 20% of red blood cells are being lysed with R8MAP8 at a concentration of $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and 80% of them at a concentration of $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$. For cells treated with R5MAP4 or R20, the hemolysis is null at $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and lower than 10 %

at a concentration of $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$. These results can be correlated with the aforementioned cytotoxicity of the peptides (**Figure. S3.2.**) where R8MAP8 was highly cytotoxic on fibroblasts at concentrations higher than $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. In contrast, both R5MAP4 and R20 showed no cytotoxicity towards fibroblasts in solution even at $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

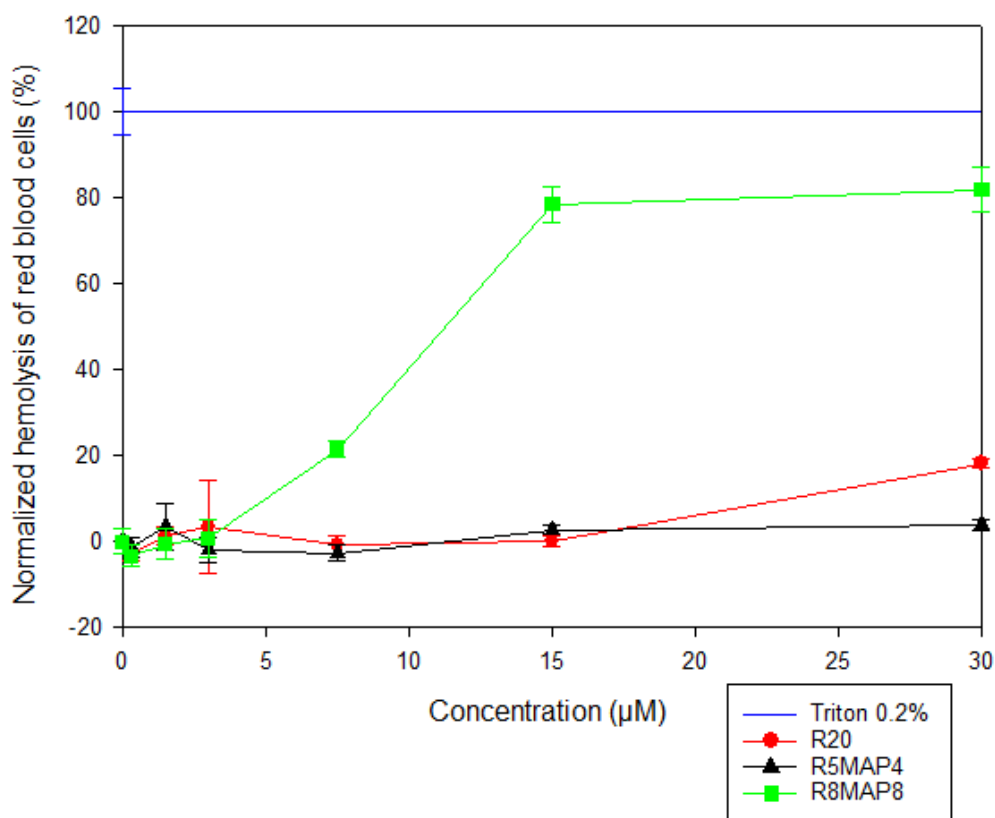


Figure 3.7. Percentage of hemolysis of a red blood cell population due to the addition of R20, R5MAP4 or R8MAP8 at various concentrations ($\mu\text{g.mL}^{-1}$). The results were normalized with a control in which red blood cells were placed in Triton 0.2 %. 100% of hemolysis was obtained with a control in which cells were treated with Triton 0.2%. The experiments were made three time in an independent manner, with three measures for all conditions in each experiment. The graph represents averages and error bars represent standard errors of the mean.

3.2.4.3. Computational studies

These *in vitro* results were unexpected. Indeed, our first hypothesis was that increasing the number of arginine units and the number of arms of the MAP will increase the antibacterial properties. However, the results showed higher antibacterial properties for R5MAP4 compared to R8MAP8. To better understand these observations, molecular simulations have been performed. First, the conformation of the peptides was studied and then the adsorption of the peptide to the bacterial membrane and the interactions between both were simulated.

The peptides R5MAP4, R8MAP8 and R20 exhibit diverse activities, warranting an investigation of their structure-activity relationships. Thus molecular dynamics simulations were employed

to explore the behavior of these peptides in aqueous environments and in the vicinity of bacterial membranes, with the aim of elucidating their ability to interact and disrupt such membranes.

3.2.4.3.1. Peptides alone

Examination of molecular dynamics trajectories for the three peptides indicates a lack of stable structural organization, with no discernible presence of secondary structure elements typically observed in proteins. These observations are in line with the three peptides' inherent topological characteristics, sizes, and charges.

The visualization of the trajectories has revealed a globular shape for the three investigated peptides, which prompted an analysis of their compactness based on their gyration radius. The results are presented in **Figure 3.8.**, which demonstrates that, despite their inherent flexibility, R5MAP4 and R8MAP8 exhibit sharply defined Gaussian distributions, centered at 13.6 Å and 21.7 Å, respectively. In contrast, the gyration radius distribution for R20 differs from a Gaussian shape, and is more diffuse, indicating a less globular and more fluctuating conformation. Thus, the present molecular dynamics study establishes that while R5MAP4 and R8MAP8 exhibit globular shapes with distinct radii, R20 has a comparatively less globular structure.

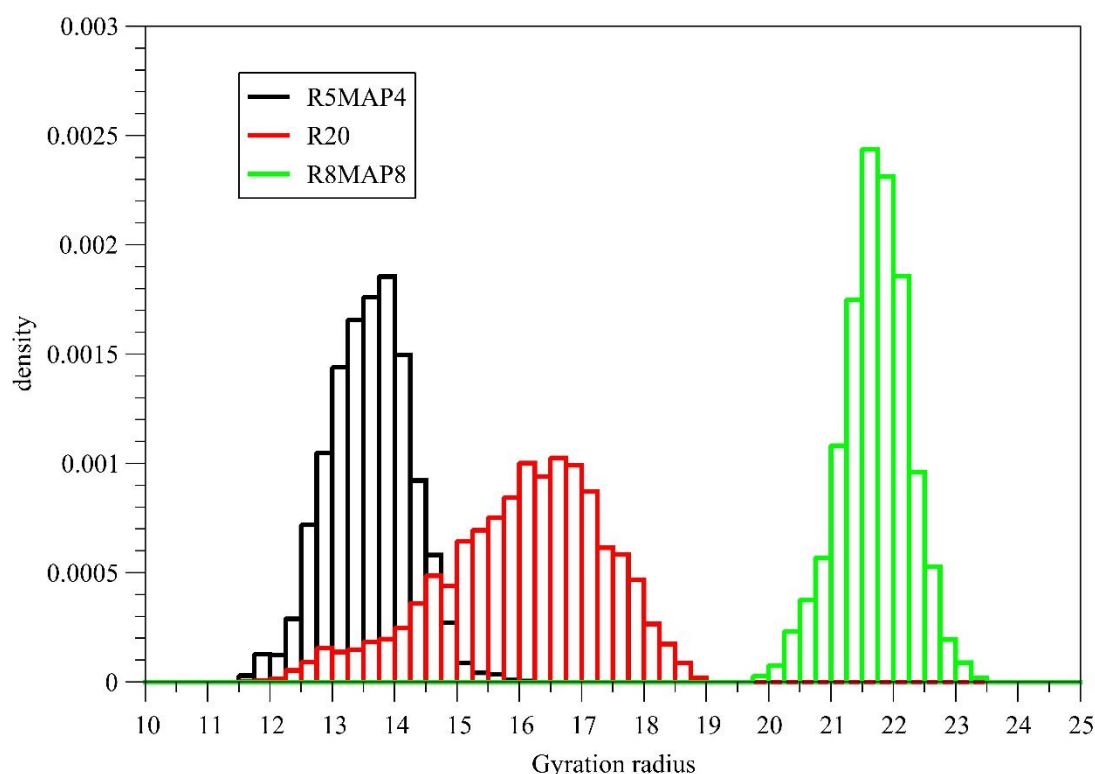


Figure 3.8. Distribution of gyration radius for R5MAP4, R20 and R8MAP8 determined from MD in water boxes.

3.2.4.3.2. Interaction with bacterial membranes

While the peptides exhibited distinct behavior in terms of their radius of gyration, this alone is not sufficient to explain their differences in antibacterial activity. Therefore, an investigation of the adsorption of R20, R5MAP4 and R8MAP8 peptides was conducted through MD with the membranes of two bacterial strains, *Pseudomonas aeruginosa* (PA, a Gram positive pathogen) and *Staphylococcus aureus* (SA, a Gram negative pathogen), to decipher the mechanism of their antibacterial activities. The reader is stressed that, with these simulations, it could not be expected to observe membrane permeabilization, pore formation or destruction as this is likely to occur over longer timescales and with the combined action of multiple peptides. Therefore, the focus was only on the initial stage of adsorption, hypothesizing that the more a peptide perturbs the membrane on its own, the stronger is its antibacterial activity⁴³. Each membrane system was subjected to a MD simulation time of 1.2 μ s in its aqueous and ionic environment and ensuring that each membrane was equilibrated, as confirmed by the convergence of the area per lipid (APL) versus time (**Figure S3.3.**). Interestingly, the convergence was reached before 200 ns for the SA membrane but was only attained after around 350 ns for the PA membrane which can be explained by the fact that SA contains only oleic lipid tails whereas PA contains palmitic and oleic which thus require more simulation times to obtain the equilibrated state.

Subsequently, the peptides R20, R5MAP4, and R8MAP8 were placed above the surfaces of the membranes, and an additional 1.2 μ s of MD simulations were conducted. Notably, all peptides were observed to adsorb onto the membranes during the first 200 ns of simulation. This was evidenced for all the four replicas indicating the reproducibility of this phenomenon. To elucidate and quantify the impact of peptide adsorption, we examined classical metrics of membrane perturbation, namely APL and deuterium order parameter (SCD) which were computed after 1 μ s to ensure the equilibration of the systems.

When peptides adsorb onto a membrane surface, the APL value is changed and it is considered that the more it moves away from the reference value, the more the impact of the peptide on the integrity of the membrane is consequent⁴⁴. **Table 3.1.** lists the average values of APL along with their standard deviations for PA and SA membranes alone and with R20, R5MAP4, and R8MAP8 peptides.

Table 3.1. Area per lipid average values, in Å², and standard deviations compiled for membrane alone and complexed with peptides. Computations are made for the equilibrated part of the systems, i.e. the last 200 ns. Values are for *Pseudomonas aeruginosa* (PA) and *Staphylococcus aureus* (SA) bacteria.

	PA [Å ²]	SA [Å ²]
Membrane alone	8.72 ± 0.06	11.52 ± 0.12
R20	8.92 ± 0.07	11.55 ± 0.11
R5MAP4	9.26 ± 0.07	12.25 ± 0.11
R8MAP8	8.88 ± 0.06	11.60 ± 0.13

Based on the values presented in **Table 3.1.**, the following information can be extracted: all peptides appear to have an impact on membrane organization. However, the peptide R5MAP4 significantly disrupts PA and SA membranes to a greater extent. It should be noted that for SA, the impact of R20 and R8MAP8 is more moderate compared to PA, where a clear change in behavior is observed. All these findings suggest that the three peptides have differential effects on the membrane properties, with R5MAP4 having a greater influence on lipid packing compared to R8MAP8 and R20.

The observation of such behavior is interestingly correlated with the analyses of SCD as shown on **Figure 3.9.**. In fact SCD reflects the orientation and mobility of the lipid acyl chains so that any change characterize the effects of peptides interactions on membranes ⁴⁵. A decrease in this parameter indicates significant disorganization of lipids, and is indicative of the strength of the effect on the membrane. In this context, with regard to PA and SA, the study finds that R5MAP4 has the strongest impact on lipid organization, which is correlated with its biological activity. In the case of SA, both R8MAP8 and R20 have a moderate, yet observable, effect, with no distinction between them being possible. On the other hand, in the case of PA, there is a more notable effect from R8MAP8 and R20, which is consistent with the measurements of APL. It is noteworthy that the phospholipids, namely DOPE for PA, and DOPG and DOPC for SA, feature an oleoyl-type lipid containing a double bond. This double bond naturally introduces disorder into the membrane, which is manifested by a drastic decrease in the lipid tail order parameter (SCD) specifically at carbons 10 and 11.

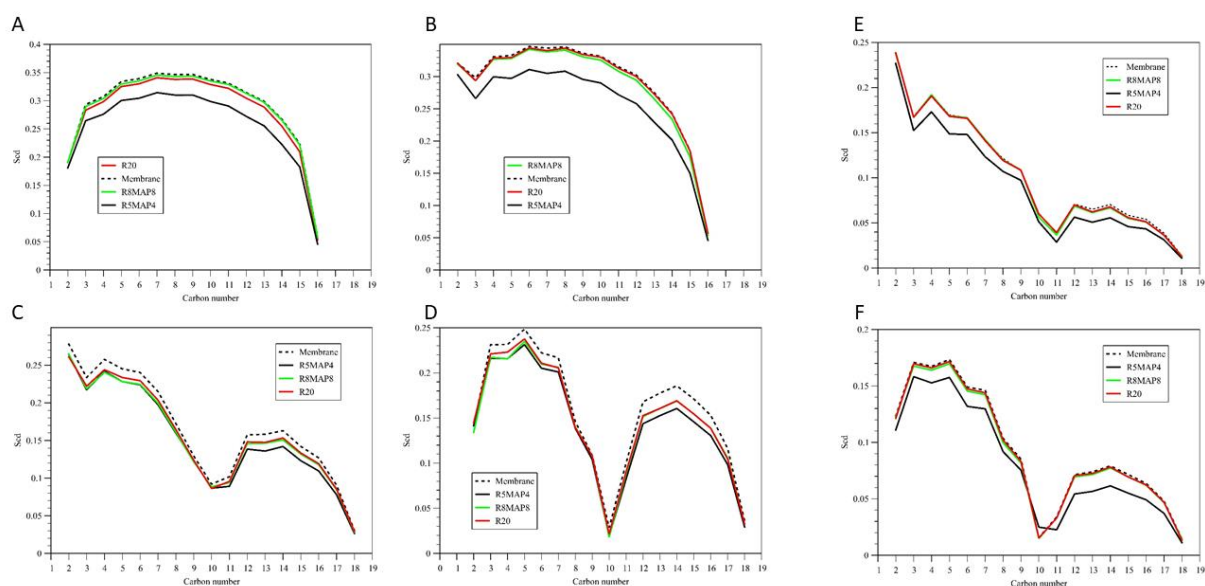


Figure 3.9. Order parameter (S_{CD}) of lipid bilayers without (dash line) or in the presence of R5MAP4 (black), R8MAP8 (green) and R20 (red) peptides. For *Pseudomonas aeruginosa*, A and B represent, respectively, the SN-1 and SN-2 of palmitic lipids whereas C and D represent, respectively, the SN-1 and SN-2 of oleic lipid. For *Staphylococcus aureus*, where only the oleic lipid tail exists, E and F refer to the SN-1 and SN-2 of this lipid.

The structural analyses of the R20, R5MAP4 and R8MAP8 interaction with PA and SA membranes are illustrated on **Figure 3.10**. It is noteworthy that all peptides lie completely on the surface of membranes except for R8MAP8 on the SA membrane. On the latter, R8MAP8 presents two of its chains composed of 8 arginine residues that do not interact with the membrane and remain exposed to the solvent. This observation is not random as it occurs for all 4 replicas of this simulation and it is important to note that the R8MAP8 peptide has sufficient space to lie completely on the SA membrane. We note that for the bacterium PA, R8MAP8 manages to lie completely on its membrane. This phenomenon can be explained by the fact that the SA membrane is distinct from that of PA by their polar heads. Specifically, PA contains the polar heads 3-phosphoethanolamine (PE) and 3-phosphoglycerol (PGR) while SA contains the polar heads 3-phosphocholine (PC) and PGR. Since PC is neutral while PE is negative, this induces a stronger electrostatic field for PA than for SA, resulting in a stronger electrostatic attraction and complete adsorption of R8MAP8 to PA.

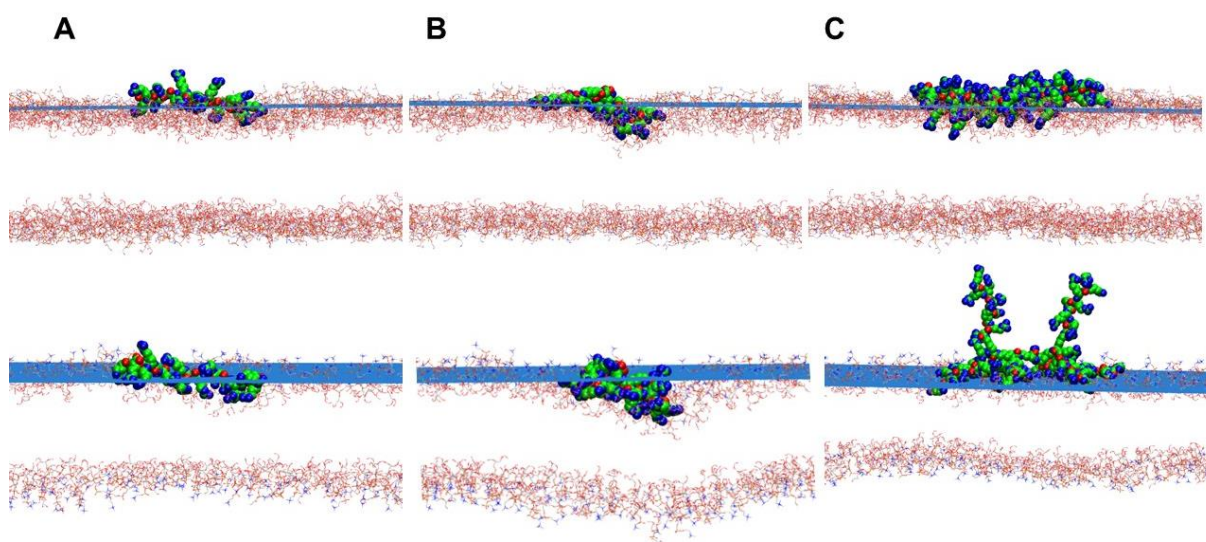


Figure 3.10. Structural interactions of R20 (A), R5MAP4 (B) and R8MAP8 (C) with the PA (top) and SA (bottom) membranes. For the sake of clarity, water, ions, lipid tails and hydrogens are not displayed. Peptides are presented with VDW spheres whereas the head of phospholipids moieties are with lines. To localize easily the average position of the upper membrane leaf a plane is displayed in blue.

For our peptides, the antimicrobial activity should result from the disruption of the bacterial membrane. To easily visualize this phenomenon, the average position of the upper membrane leafs are displayed in **Figure 3.10**. to identify the peptide parts which deeply affect the membrane organization. All peptides establish electrostatic interactions with their positively charged arginine residues and the polar heads of phospholipids. However, depending on their topology and structural organization, different behaviors are observed. The R8MAP8 and R20 peptides do not penetrate deeply into the membrane and remain on a surface, which induces a minor perturbation. In contrast, R5MAP4 shows a more pronounced effect with a strong penetration into the membranes, as easily observed in **Figure 3.10**.. This behavior is notably similar for both studied bacteria. This biological activity echoes the gyration radius measurements, where R5MAP4 presents a spherical organization, like R8MAP8, unlike R20 with a smaller radius than R8MAP8. Our results demonstrate that biological activity is not directly correlated with the number of positive charges, i.e., the number of arginine residues, but with a distinct structural organization on the membrane. Thus, R5MAP4, with its spherical aspect and charge density, exerts a stronger constraint on bacterial membranes, inducing better antimicrobial activity.

3.2.5. Conclusion and perspectives

Previously we showed that the size of linear poly (L-arginine) has strong effect on the MIC and antibacterial properties of the peptide. With this work, we presented that the shape and configuration of the polypeptide has also an impact on the antibacterial properties of the

molecule. Some MAP peptides show higher antibacterial properties than a linear peptide for the same number of arginine residues. Moreover, the molecular simulation demonstrated that this antibacterial activity was due to the adsorption/interaction of the peptide to the bacterial membrane and that the mechanical deformation of the bacterial membrane was much higher with a MAP peptide than a linear one. Besides, bigger molecules with longer arms do not present better antibacterial properties even though the number of positive charges is higher. The molecular simulation shows indeed that the spherical structure of bigger molecules is more compact and due to steric hindrance, the peptide cannot lay down to the bacteria surface. Thus, the molecular dynamic simulation helped us to understand the difference in the mechanism of a linear and a MAP peptide.

Now that we proved that there is difference in the antibacterial activities between linear and MAP peptides, the further step is to add MAP peptides in biomaterials, such as multilayer coatings or hydrogels to see the effect on antibacterial properties and to see if these properties can be improved by the addition of these small peptides.

3.3. Résultats complémentaires

L'étude des peptides ramifiés « MAP » de PAR a permis de démontrer que la structure du peptide a une influence sur ses propriétés antibactériennes. Notamment, il a été prouvé qu'un peptide branché, constitué de 4 branches de PAR chacune comportant 5 arginines (R5MAP4) présente de meilleures propriétés antibactériennes qu'un peptide linéaire constitué du même nombre d'arginines, c'est-à-dire de 20 arginines. En effet, le peptide ramifié « MAP » s'adsorbe probablement plus fortement dans la membrane bactérienne avec une densité locale de charge plus importante, induisant une déformation et un stress mécanique de cette membrane plus conséquent.

L'objectif suivant est d'utiliser ces peptides branchés dans des biomatériaux. Pour cela, une étude complémentaire sur des revêtements multicouches de polyélectrolytes a été effectuée. Des films multicouches à base de PAR de différentes tailles (notamment de la poly(L-arginine) de 30 arginines (PAR30)) et d'acide hyaluronique (HA)) ont été développés au laboratoire UMR_S 1121 par pulvérisation / spray ou trempages successifs dans les solutions des deux polyélectrolytes (« dip coating »). Grâce aux interactions électrostatiques entre les charges positives de la PAR30 et les charges négatives du HA, le revêtement peut être construit couche après couche (**Figure 3.11.A**). Différentes épaisseurs de films peuvent être obtenues en fonction du nombre de « bicouches » de polyélectrolytes déposées sur les surfaces. Comme décrit en début de chapitre, la diffusion de la PAR30 au sein des films et sa libération

confèrent aux revêtements des propriétés antibactériennes sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

Il s'agit ici d'utiliser ces premières études effectuées sur les multicouches (PAR30 / HA)_n et d'ajouter en dernière couche un peptide ramifié R5MAP4 (qui comporte 20 monomères d'arginine). Une comparaison de l'activité antibactérienne de ces revêtements avec un revêtement témoin utilisant en dernière couche du film (PAR30 / HA) un peptide linéaire PAR20 est également présentée. Différentes multicouches ont été construites : une multicouche (PAR30 / HA)₁₂ avec le peptide branché R5MAP4 ajouté en dernière couche du revêtement, une multicouche (PAR30 / HA)₁₂ avec ajout en dernière couche de PAR20 et enfin une multicouche (PAR30 / HA)₁₂ avec ajout d'une dernière couche de PAR30, soit (PAR30 / HA)₁₂ / PAR30) (**Figure 3.11.B**).

Cette étude a été effectuée avec l'aide de Pauline Schmitt, stagiaire de première année à l'Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg que j'ai co-encadrée.

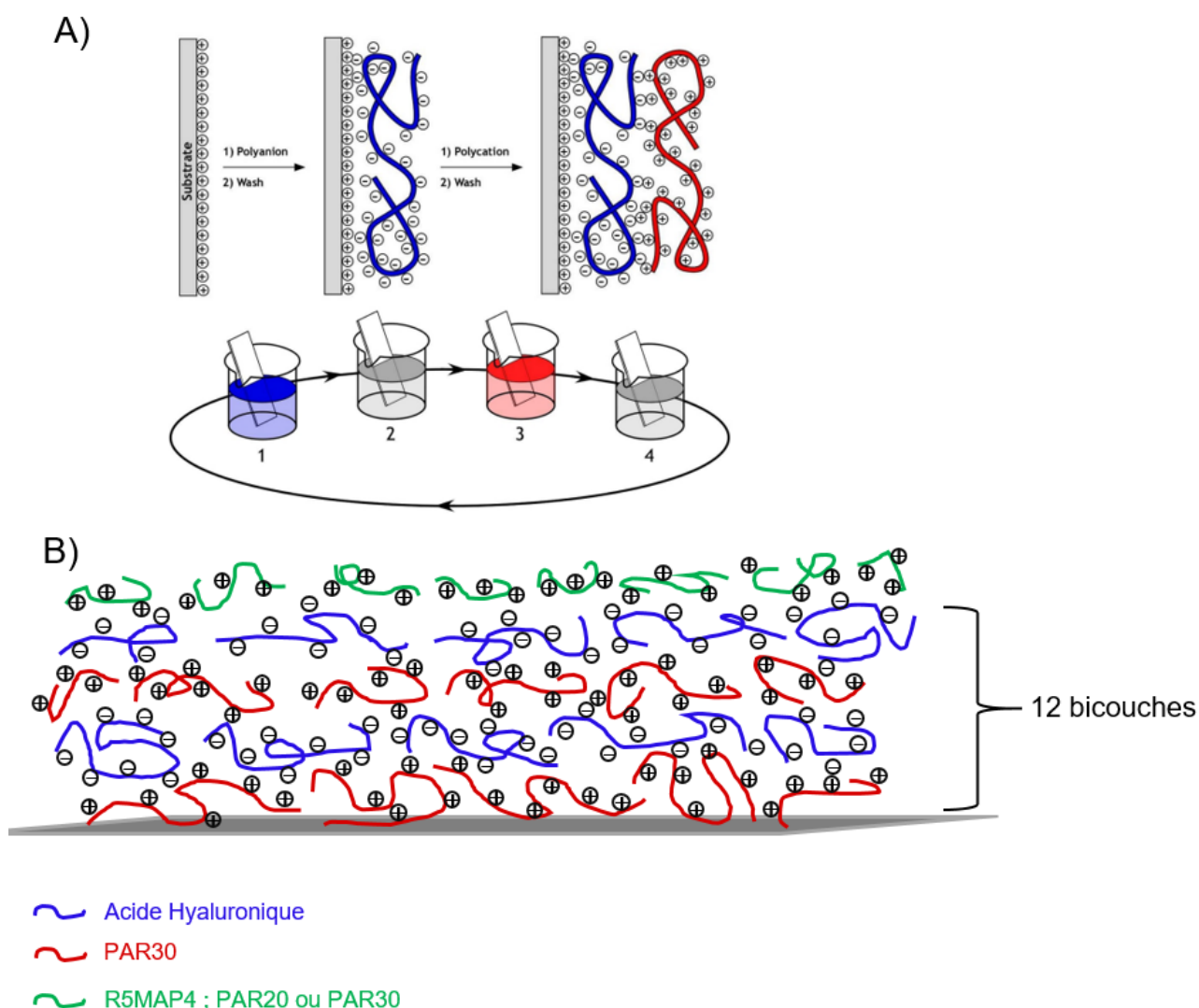


Figure 3.11. (A) Principe de la construction de revêtements multicouches de polyélectrolytes par la méthode de trempages successifs. Une surface est trempée dans une solution de polyélectrolyte chargé (de charge opposée à celle du substrat) (1), puis une étape de rinçage dans un tampon est effectuée pour retirer les chaînes n'interagissant pas avec la surface (2). Ensuite, le substrat avec cette première couche est trempé dans une solution contenant le second polyélectrolyte, de charge opposée au premier (3), avant d'être rincé une nouvelle fois pour les mêmes raisons que citées précédemment (4). Le processus est ensuite recommencé autant de fois que souhaité pour atteindre le nombre de bicouches et l'épaisseur voulus ⁴⁶. (B) Schéma de la multicouche formée sur lamelles de verre de 12 mm de diamètre pour les tests d'activité antimicrobienne et de cytotoxicité.

3.3.1. Préparation des revêtements pour les tests *in vitro*

Différents tests *in vitro* ont été effectués. A cette fin, des multicouches ((PAR30 / HA)₁₂) bicouches ont été construites au robot à l'aide d'un bras automatisé (Dipping Robot, Riegler et Kirstein, GmbH Berlin, Allemagne). Le système est constitué d'un portoir permettant de disposer des lamelles de verre qui est relié à un bras automatisé. Les solutions de polyélectrolytes et les solutions de rinçage sont préparées en amont et placées en dessous du portoir. Le bras automatique permet de plonger le portoir dans les différentes solutions en fonction du programme de construction.

Ainsi, des solutions de PAR30 et de HA de 823 kDa à 0.5 mg.mL⁻¹ dans des solutions tampons Tris 10 mM / NaCl 0.15 M à pH 7.4 (Tris / NaCl) ont été préparées. Des lamelles de verre de 12 mm de diamètre (Knittel Glass, Allemagne) ont été préalablement nettoyées dans un détergent (Hellmanex III à 2 %, Hellma, Allemagne) pendant 30 minutes, suivi d'un nettoyage à l'éthanol 70 % sous ultrasons pendant 15 minutes. Sont effectués ensuite des dépôts successifs des deux polyélectrolytes par trempages successifs de ces lamelles de verre dans les différentes solutions de polyélectrolytes et de rinçage. Une étape de rinçage est effectuée entre chaque dépôt de polyélectrolyte. Le rinçage permet d'éliminer les chaînes n'interagissant pas avec la surface. La première couche déposée est une couche de polycation, la PAR30. A la fin de la construction des 12 bicouches, les lamelles sont trempées, soit dans une solution de PAR30 à 0.5 ou 1 mg.mL⁻¹, soit dans une solution de R5MAP4 à 0.5 ou 1 mg.mL⁻¹ ou bien dans la solution de PAR20 à 0.5 ou 1 mg.mL⁻¹.

3.3.2. Adsorption du peptide dans la multicouche PAR30 / HA

Avant d'effectuer les tests *in vitro*, la possibilité d'intégrer le peptide ramifié « MAP » en fin de construction de la multicouche PAR30 / HA a été analysée par microbalance à cristal de quartz (QCM) (Q-Sense, Göteborg, Suède). Le but ici est de suivre l'adsorption des différents peptides d'étude en dernière couche ou au sein de la totalité du revêtement d'une multicouche (PAR30 / HA)₅.

La QCM est une technique qui permet de détecter des changements de masse déposée sur une surface à l'échelle du nanogramme par cm². Le principe est basé sur les propriétés piézoélectriques d'un cristal de quartz, c'est-à-dire sur sa capacité à changer de fréquence lorsqu'il est contraint mécaniquement. Ainsi, lorsqu'une molécule, par exemple un polyélectrolyte, se dépose à la surface du cristal, la masse à la surface du cristal augmente et cette variation de masse entraîne une variation de la fréquence de résonance du cristal. Si l'on fait abstraction de l'élasticité et de la viscosité du dépôt, les variations de masse et de fréquence sont reliées par l'équation de Sauerbrey :

$$\Delta m = \frac{-C}{n} \times \Delta f$$

avec n la $n^{\text{ème}}$ harmonique, C une constante dépendant des propriétés du cristal utilisé et Δf le changement de fréquence ⁴⁷. Une description détaillée de la technique de QCM peut être trouvée dans les articles de Picart *et al.* et Benkirane-Jessel *et al.* ^{46, 48}.

Les modifications de la fréquence de résonance du cristal au cours du temps pourront être enregistrées afin d'observer, dans notre cas, les dépôts successifs des polyélectrolytes lors de la formation d'une multicouche.

Dans ce test, 5 bicouches (PAR30 / HA) sont formées sur le cristal de quartz en commençant par la couche de PAR30. 5 minutes après chaque injection d'un polyélectrolyte, une étape de rinçage avec le tampon Tris / NaCl est effectuée pour éliminer toutes les chaînes de polyélectrolytes qui n'interagissent pas avec la surface. Une fois les 5 bicouches formées, le peptide R5MAP4 est ajouté. Une étape de rinçage est effectuée une heure après le dépôt du peptide, puis la solution de HA est ajoutée de manière à vérifier que le peptide R5MAP4 s'est bien déposé à la surface de la multicouche. Les fréquences étudiées sont celles de la troisième harmonique, considérée comme la plus stable. Les résultats présentés sur la **Figure 3.12.A** et **3.12.B** montrent l'évolution de la différence de fréquence normalisée par rapport à la troisième harmonique $\frac{-\Delta f}{\nu}$ au cours du temps lors de la construction de la multicouche (PAR30 / HA)₅ / R5MAP4 / HA et la **Figure 3.12.C** présente l'évolution de la différence de fréquence en fonction du nombre de couches, après rinçage et dépôt de chaque couche. Lors de l'observation des signaux, on observe tout d'abord que $\frac{-\Delta f}{\nu}$ augmente exponentiellement avec le nombre de bicouches (PAR30 / HA). Cela indique d'une part que la multicouche (PAR30 / HA) se construit correctement dans le tampon utilisé, mais également que la construction présente des phénomènes de diffusion au sein même de la multicouche, ce qui est en accord avec les études précédemment effectuées au laboratoire ⁴⁸. Ensuite, une augmentation de la différence de fréquence est observée lors de l'injection du peptide R5MAP4 dans la multicouche. Cela laisse supposer que le peptide interagit avec la surface du film et notamment la dernière « couche » de HA, probablement via des interactions électrostatiques. Lors du rinçage qui suit, une diminution de signal est observée. Cette dernière suggère que le peptide R5MAP4 se détache complètement lors du rinçage car le signal $\frac{-\Delta f}{\nu}$ redevient identique à celui mesuré avant ajout de R5MAP4. Cependant, lorsque du HA est injecté après ce dernier rinçage, une nouvelle augmentation du signal indique que le polyanion

HA se dépose en surface, donc que le film comporte probablement des charges positives suite à l'injection de R5MAP4 précédente. Ainsi, la diminution de signal observée lors du précédent rinçage est peut-être due à la libération d'eau de la multicouche. En effet, la technique de QCM permet d'avoir une information sur le dépôt de polyelectrolytes mais la masse d'eau du film est également considérée. Afin de valider l'hypothèse précédente, la même expérience a été effectuée en remplaçant le dépôt de R5MAP4 par un dépôt de PAR20 du même fournisseur (Pepmic, Chine), et par de la PAR10 synthétisée par un fournisseur différent (Alamanda polymers, Etats-Unis).

Les résultats obtenus pour une multicouche (PAR30 / HA)₅ / PAR20 / HA en dernière bicouche sont présentés sur la **Figure 3.12.A. et 3.12.B.**. Comme lors du dépôt de R5MAP4, une augmentation de la différence de fréquence est observée, qui est suivie, lors du rinçage avec le tampon Tris/ NaCl, d'une diminution du signal plus importante que cette première augmentation. Ensuite, lors de l'ajout de HA, une nouvelle augmentation du signal est observée, ce qui montre bien l'interaction du peptide PAR20 avec la multicouche. Par contre, lors de l'ajout de PAR10 après le dépôt de 5 bicouches (PAR30 / HA), une augmentation de la différence de fréquence beaucoup plus importante que précédemment est observée lors de l'ajout du peptide (environ 35 Hz alors qu'avec les peptides R5MAP4 et PAR20, cette augmentation est inférieure à 10 Hz) (**Figure 3.12.C.**). De plus, la diminution de la différence de fréquence lors du rinçage qui suit est inférieure à l'augmentation obtenue lors de l'ajout du peptide PAR10. Ainsi, il est possible de déposer facilement de la PAR10 donc la PAR20 doit également être capable de se déposer et d'interagir avec la multicouche (PAR30 / HA), ce qui permet de valider l'hypothèse que les peptides R5MAP4 et PAR20 se déposent bien à la surface de la multicouche.

Ainsi, les différents tests effectués par QCM permettent de montrer la possibilité d'ajouter les peptides R5MAP4 ou PAR20 linéaire sur une multicouche PAR30 / HA.

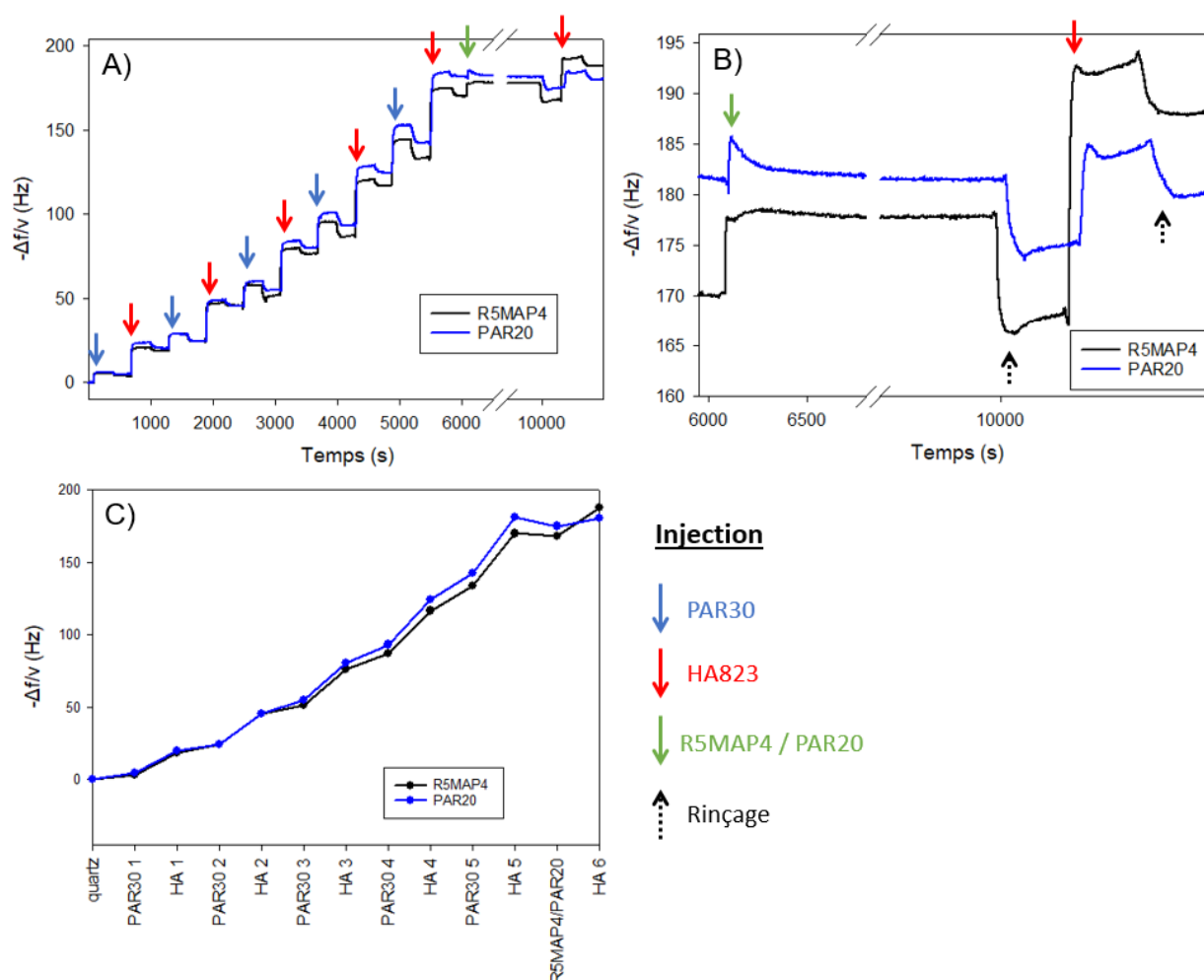


Figure 3.12. Suivi de la différence de fréquence de résonance de la 3^{ème} harmonique au cours du temps par QCM lors des dépôts successifs des polyélectrolytes. La première couche déposée est une couche de PAR30. Chaque dépôt de polyélectrolyte est suivi par un rinçage avec du tampon Tris 10 mM / NaCl 0.15 M à pH 7.4 (Tris / NaCl). Cinq bicouches (PAR30 / HA) sont formées, puis le peptide R5MAP4 (courbe en noir) ou PAR20 (courbe en bleu) est injecté. Un rinçage au tampon Tris / NaCl est effectué une heure après l'injection du peptide. Enfin, une dernière injection de HA est effectuée afin de vérifier que le peptide R5MAP4 est bien présent à la surface de la multicouche. Evolution de la différence de fréquence de résonance au cours du temps lors du dépôt des multicouches (PAR30 / HA)₅ / R5MAP4 / HA et (PAR30 / HA)₅ / PAR20 / HA (A). Evolution de la différence de fréquence de résonance au cours du temps lors du dépôt des deux dernières couches de la construction (B). Evolution de la différence de fréquence de résonance en fonction du nombre de couches (valeur de $\frac{-\Delta f}{\nu}$ après dépôt et rinçage de chaque couche (C).

3.3.3. Etude de l'activité antibactérienne des multicouches sur *S. aureus*

L'activité antibactérienne des multicouches (PAR30 / HA)₁₂ / PAR30 ou (PAR30 / HA)₁₂ / R5MAP4 ou (PAR30 / HA)₁₂ / PAR20 a été étudiée sur une bactérie Gram positif, le *S. aureus* (ATCC 25923). Pour cela, les lamelles de verre sur lesquelles les

revêtements ont été construits sont placées dans une plaque 24 puits et 500 μL de suspension bactérienne à une concentration de $8 \times 10^5 \text{ CFU.mL}^{-1}$ ont été ajoutés dans chaque puits. Les échantillons ont ensuite été placés à 37 °C et sous agitation pendant 24 h. Après ces 24 h, la DO à 620 nm du surnageant de chaque puits a été mesurée, puis ces valeurs de DO ont été normalisées à partir de contrôles comme détaillé dans la partie 2.3.2. de la section « Matériels et méthodes ».

Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 3.13**. Tout d'abord, les multicouches (PAR30 / HA)₁₂ / PAR30 présentent une activité antimicrobienne limitée en comparaison avec les deux autres multicouches. En effet, l'utilisation d'un film (PAR30 / HA)₁₂ avec l'ajout de PAR30 en dernière couche permet une diminution de la croissance bactérienne de 45 % pour une concentration de 0.5 mg.mL^{-1} et de 70 % pour une concentration de 1 mg.mL^{-1} alors que cette diminution est de 96 % lors de l'ajout de R5MAP4 à 0.5 mg.mL^{-1} en dernière couche et de 99 % lors de l'ajout de R5MAP4 à 1 mg.mL^{-1} , PAR20 à 0.5 mg.mL^{-1} ou de PAR20 à 1 mg.mL^{-1} en dernière couche. Ainsi, l'activité antimicrobienne en présence de multicouches constituées d'une dernière couche de R5MAP4 ou de PAR20 est significativement différente de celle mesurée lorsque la dernière couche déposée est une couche de PAR30. Cependant, aucune différence significative ne peut être observée entre les activités des multicouches avec ajout de R5MAP4 ou de PAR20 en dernière couche. Ainsi, les multicouches (PAR30 / HA)₁₂ / R5MAP4 et (PAR30 / HA)₁₂ / PAR20 présentent des propriétés antibactériennes intéressantes après 24 h sur *S. aureus* mais rien n'indique que l'un des deux peptides permet une plus forte diminution de l'infection. Cependant, il est également important de vérifier la cytotoxicité des revêtements construits pour voir si des différences sont observées en fonction du peptide présent en dernière couche.

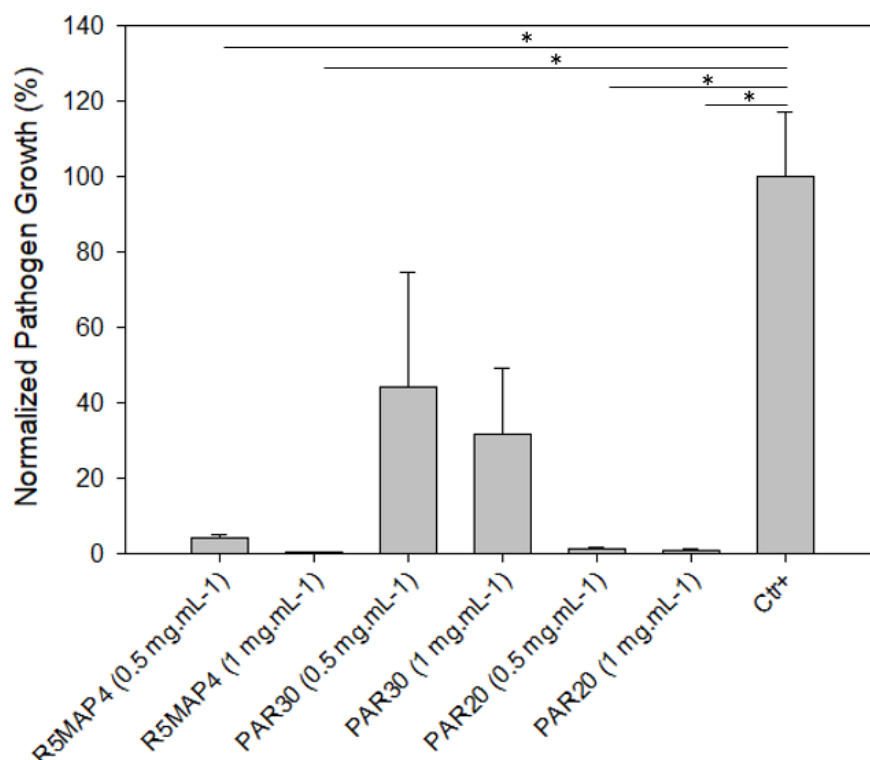


Figure 3.13. Croissance bactérienne de *S. aureus* normalisée par rapport au contrôle positif sans traitement. La croissance bactérienne est déterminée par une mesure de la DO du surnageant après 24 h de contact des bactéries avec les échantillons. Chaque lamelle de verre a d'abord été recouverte d'une multicouche de 12 bicouches PAR30 / HA, construite au robot. Ensuite, une dernière couche soit de R5MAP4, soit de PAR30, soit de PAR20 a été ajoutée manuellement. Deux concentrations de peptides ont été utilisées pour la dernière couche : 0.5 ou 1 mg.mL⁻¹. Chaque échantillon a été préparé en triplicat. Le graphique représente la valeur moyenne de la DO normalisée, les barres d'erreur représentent les erreurs standard à la moyenne. **p* < 0.05.

3.3.4. Etude de la cytotoxicité des revêtements sur des cellules fibroblastes

La cytotoxicité des revêtements construits sur des lamelles de verre vis-à-vis de cellules fibroblastes BALB/3T3 après 24 h de contact a été évaluée grâce à un test MTT comme décrit dans la partie 2.4.1. de la section « Matériels et méthodes ». Seule la cytotoxicité en extrait a été testée. Pour cela, les lamelles de verre ont été préparées comme expliqué précédemment et les cytotoxicités liées à la présence des multicouches (PAR30 / HA)₁₂ avec ajout d'une dernière couche de PAR30, de PAR20 ou de R5MAP4 à 1 mg.mL⁻¹ dans le tampon Tris / NaCl ont été comparés. Chaque échantillon a été extrait dans 1.8 mL de milieu de culture cellulaire en accord avec la norme ISO 10993-12 utilisée.

Les résultats sont présentés sur la **Figure 3.14**. Aucune des conditions n'induit de cytotoxicité sur les cellules BALB/3T3. En effet, l'activité métabolique est supérieure à 70 % pour toutes les conditions lorsque les cellules sont cultivées dans 100 % de milieu d'échantillon extrait.

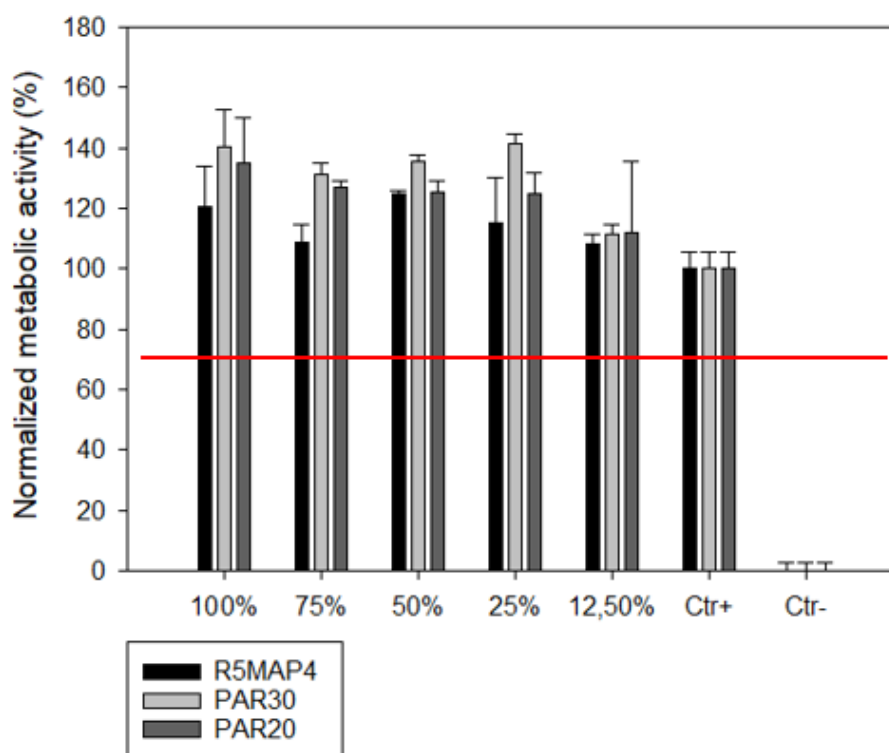


Figure 3.14. *Activité métabolique des cellules BALB/3T3 normalisée après 24 h de culture dans du milieu de culture dans lequel les revêtements ont été extraits. Différentes concentrations de ces milieux extraits ont été utilisés (12.5, 25, 50, 75 et 100 %). Des multicouches (PAR30 / HA)₁₂ + PAR30 ou R5MAP4 ou PAR20 à 1 mg.mL⁻¹ ont été étudiées. Trois échantillons ont été testés pour chaque condition. L'activité métabolique a été normalisée par rapport à un contrôle lors duquel les cellules ont été cultivées pendant 24 h dans du milieu de culture seul. La ligne rouge correspond à une activité métabolique de 70 %, valeur minimale pour classer un matériau comme étant non cytotoxique selon la norme ISO10993-5. Les résultats représentés sont les moyennes des triplicats et les barres d'erreur représentent les écarts-types.*

3.4. Conclusion

Dans cette étude, les activités antibactériennes des peptides branchés de poly(L-arginine) ont d'abord été étudiés. Différents tests *in vitro* ont été effectués au laboratoire afin de comparer l'activité de peptides branchés par rapport à des peptides linéaires. Ainsi, la CMI de chaque peptide a été déterminée sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. En parallèle de ces études *in vitro*, les interactions entre les différents peptides et la membrane externe de bactéries à Gram positif et à Gram négatif ont été modélisées par simulation moléculaire. Ces

résultats ont permis de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lorsqu'un peptide est mis au contact d'une bactérie. En effet, les modélisations montrent que le peptide s'adsorbe à la surface de la membrane bactérienne, la perturbe en induisant un stress mécanique, ce stress étant plus important lorsque la poly(L-arginine) présente une structure branchée en comparaison avec une structure linéaire. Une fois les expériences *in vitro* d'activités effectuées sur le peptide en solution, l'intérêt d'ajouter ces peptides branchés à la place de peptides linéaires dans des constructions multicouches a été étudié. Pour cela, les différents peptides étudiés précédemment ont été ajoutés en dernière couche de revêtements multicouches connus au laboratoire afin de vérifier si l'ajout d'un peptide branché par rapport à un peptide linéaire permettait d'améliorer les propriétés antibactériennes. Il a été prouvé que les peptides PAR20 et R5MAP4 améliorent les propriétés antibactériennes des multicouches (PAR30 / HA)_n.

D'autres tests pourraient être également effectués en modifiant par exemple le nombre de couches déposées ou en modifiant les concentrations du peptide de la dernière couche. Aussi, il est possible d'envisager d'ajouter ces peptides dans des systèmes d'hydrogels afin de diminuer le risque d'infections pour des applications de cicatrisation tissulaire par exemple ⁴⁹.

Bibliographie

1. Inserm, Infections nosocomiales - Ces microbes qu'on « attrape » à l'hôpital, <https://www.inserm.fr/dossier/infections-nosocomiales/>, 2020).
2. J. Malheiro and M. Simões, in *Biofilms and Implantable Medical Devices*, eds. Y. Deng and W. Lv, 2017, DOI: 10.1016/C2014-0-04106-8, ch. 4, pp. 97-113.
3. A. Mutschler, L. Tallet, M. Rabineau, C. Dollinger, M.-H. Metz-Boutigue, F. Schneider, B. Senger, N. E. Vrana, P. Schaaf and P. Lavalley, *Chemistry of Materials*, 2016, **28**, 8700-8709.
4. CDC, HAI and Antibiotic Use Prevalence Survey, <https://www.cdc.gov/hai/eip/antibiotic-use.html>).
5. CDC, Data Portal: From the HAI Hospital Prevalence Survey, <https://www.cdc.gov/hai/data/portal/index.html>).
6. W. H. Organization, Antimicrobial resistance, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>).
7. M. Frieri, K. Kumar and A. Boutin, *J Infect Public Health*, 2017, **10**, 369-378.
8. B. Mehrjou, Y. Wu, P. Liu, G. Wang and P. K. Chu, *Adv Healthc Mater*, 2022, DOI: 10.1002/adhm.202202073, e2202073.
9. M. Pasupuleti, A. Schmidtchen and M. Malmsten, *Crit Rev Biotechnol*, 2012, **32**, 143-171.
10. J. Y. Niu, I. X. Yin, W. K. K. Wu, Q. L. Li, M. L. Mei and C. H. Chu, *Arch Oral Biol*, 2021, **122**, 105022.
11. G. M. Bohpale, *Current Pharma. Biotech.*, 2020, **21**, 90-96.
12. J. Shen, G. C. Gurtner, L. Cegelski and Y. P. Yang, *Mechanisms of Action and Chemical Origins of Biologically Active Antimicrobial Polymers*, 2020.
13. S. Li, L. Wang, J. Zhang, Z. Zhao, W. Yu, Z. Tan, P. Gao and X. Chen, *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, **10**, 1006584.
14. A. Chen, H. Peng, I. Blakey and A. K. Whittaker, *Polymer Reviews*, 2016, **57**, 276-310.
15. A. S. Abd-El-Aziz, C. Agatemor, N. Etkin, D. P. Overy, M. Lanteigne, K. McQuillan and R. G. Kerr, *Biomacromolecules*, 2015, **16**, 3694-3703.
16. M. Stach, T. N. Siriwardena, T. Kohler, C. van Delden, T. Darbre and J. L. Reymond, *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, **53**, 12827-12831.
17. T. N. Siriwardena, M. Stach, R. He, B. H. Gan, S. Javor, M. Heitz, L. Ma, X. Cai, P. Chen, D. Wei, H. Li, J. Ma, T. Kohler, C. van Delden, T. Darbre and J. L. Reymond, *J Am Chem Soc*, 2018, **140**, 423-432.

18. A. I. Khan, S. Nazir, A. Ullah, M. N. U. Haque, R. Maharjan, S. U. Simjee, H. Olleik, E. Courvoisier-Dezord, M. Maresca and F. Shaheen, *Biomolecules*, 2022, **12**.
19. J. L. Reymond, *Chimia (Aarau)*, 2021, **75**, 535-538.
20. S. Alfei and D. Caviglia, *Pharmaceutics*, 2022, **14**, 2016.
21. L. Bracci, C. Falciani, B. Lelli, L. Lozzi, Y. Runci, A. Pini, M. G. De Montis, A. Tagliamonte and P. Neri, *J Biol Chem*, 2003, **278**, 46590-46595.
22. L. Seon, P. Lavalle, P. Schaaf and F. Boulmedais, *Langmuir*, 2015, **31**, 12856-12872.
23. A. Mutschler, C. Betscha, V. Ball, B. Senger, N. E. Vrana, F. Boulmedais, A. Schroder, P. Schaaf and P. Lavalle, *Chemistry of Materials*, 2017, **29**, 3195-3201.
24. V. G. Joshi, V. D. Dighe, D. Thakuria, Y. S. Malik and S. Kumar, *Indian J Virol*, 2013, **24**, 312-320.
25. C. Almazan, L. Simo, L. Fourniol, S. Rakotobe, J. Borneres, M. Cote, S. Peltier, J. Maye, N. Versille, J. Richardson and S. I. Bonnet, *Pathogens*, 2020, **9**.
26. T. Verma, A. Aggarwal, S. Singh, S. Sharma and S. J. Sarma, *Journal of Molecular Structure*, 2022, **1248**, 131380.
27. R. Rai, S. Dubey, K. V. Santosh, A. Biswas, V. Mehrotra and D. N. Rao, *Biologicals*, 2017, **49**, 81-85.
28. S. Harm, K. Lohner, U. Fichtinger, C. Schildbock, J. Zottl and J. Hartmann, *Int J Mol Sci*, 2019, **20**.
29. R. Salomon-Ferrer, A. W. Gotz, D. Poole, S. Le Grand and R. C. Walker, *J Chem Theory Comput*, 2013, **9**, 3878-3888.
30. A. Jakalian, D. B. Jack and C. I. Bayly, *J Comput Chem*, 2002, **23**, 1623-1641.
31. W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey and M. L. Klein, *The Journal of Chemical Physics*, 1983, **79**, 926-935.
32. J. A. Maier, C. Martinez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K. Hauser and C. Simmerling, *J. Chem. Theory Comput.*, 2015, **11**, 3696-3713.
33. D. Vassetz, M. Pagliai and P. Procacci, *J Chem Theory Comput*, 2019, **15**, 1983-1995.
34. C. J. Dickson, R. C. Walker and I. R. Gould, *J Chem Theory Comput*, 2022, **18**, 1726-1736.
35. S. Jo, T. Kim, V. G. Iyer and W. Im, *J. Comput. Chem.*, 2008, **29**, 1859-1865.
36. A. Li, J. W. Schertzer and X. Yong, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2018, **20**, 23635-23648.
37. T. Zhang, Y. Qiu, Q. Luo, L. Zhao, X. Yan, Q. Ding, H. Jiang and H. Yang, *J. Phys. Chem. B.*, 2018, **122**, 1427-1438.
38. D. R. Roe and T. E. Cheatham, 3rd, *J. Chem. Theory. Comput.*, 2013, **9**, 3084-3095.
39. W. Humphrey, A. Dalke and K. Schulten, *Journal of Molecular Graphics*, 1996, **14**, 33-38.

40. M. Hyldgaard, T. Mygind, B. S. Vad, M. Stenvang, D. E. Otzen and R. L. Meyer, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2014, **80**, 7758-7770.
41. V. Gribova, L. Petit, L. Kocgozlu, C. Seguin, S. Fournel, A. Kichler, N. E. Vrana and P. Lavalley, *Macromol. Biosci.*, 2022, **22**, 2200043.
42. H. Ozcelik, N. E. Vrana, A. Gudima, V. Riabov, A. Gratchev, Y. Haikel, M. H. Metz-Boutigue, A. Carrado, J. Faerber, T. Roland, H. Kluter, J. Kzhyshkowska, P. Schaaf and P. Lavalley, *Adv Healthc Mater*, 2015, **4**, 2026-2036.
43. Y. Lyu, N. Xiang, J. Mondal, X. Zhu and G. Narsimhan, *J. Phys. Chem. B.*, 2018, **122**, 2341-2354.
44. G. Shahane, W. Ding, M. Palaikostas and M. Orsi, *J. Mol. Model.*, 2019, **25**, 76.
45. S. Moradi, A. Nowroozi and M. Shahlaei, *RSC Adv.*, 2019, **9**, 4644-4658.
46. N. Benkirane-Jessel, P. Lavalley, V. Ball, J. Ogier, B. Senger, C. Picart, P. Schaaf, J.-C. Voegel and G. Decher, in *Macromolecular Engineering: Precise Synthesis, Materials Properties, Applications*, eds. K. Matyjaszewski, Y. Gnanou and L. Leibler, 2007, ch. 14, pp. 1249-1305.
47. NanoScience Instruments, Quartz Crystal Microbalance, <https://www.nanoscience.com/techniques/quartz-crystal-microbalance/>, (2019).
48. C. Picart, J. Mutterer, L. Richert, Y. Luo, G. D. Prestwich, P. Schaaf, J.-C. Voegel and P. Lavalley, *PNAS*, 2002, **99**, 12531–12535.
49. V. Gribova, F. Boulmedais, A. Dupret-Bories, C. Calligaro, B. Senger, N. E. Vrana and P. Lavalley, *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, **12**, 19258-19267.

Figures complémentaires

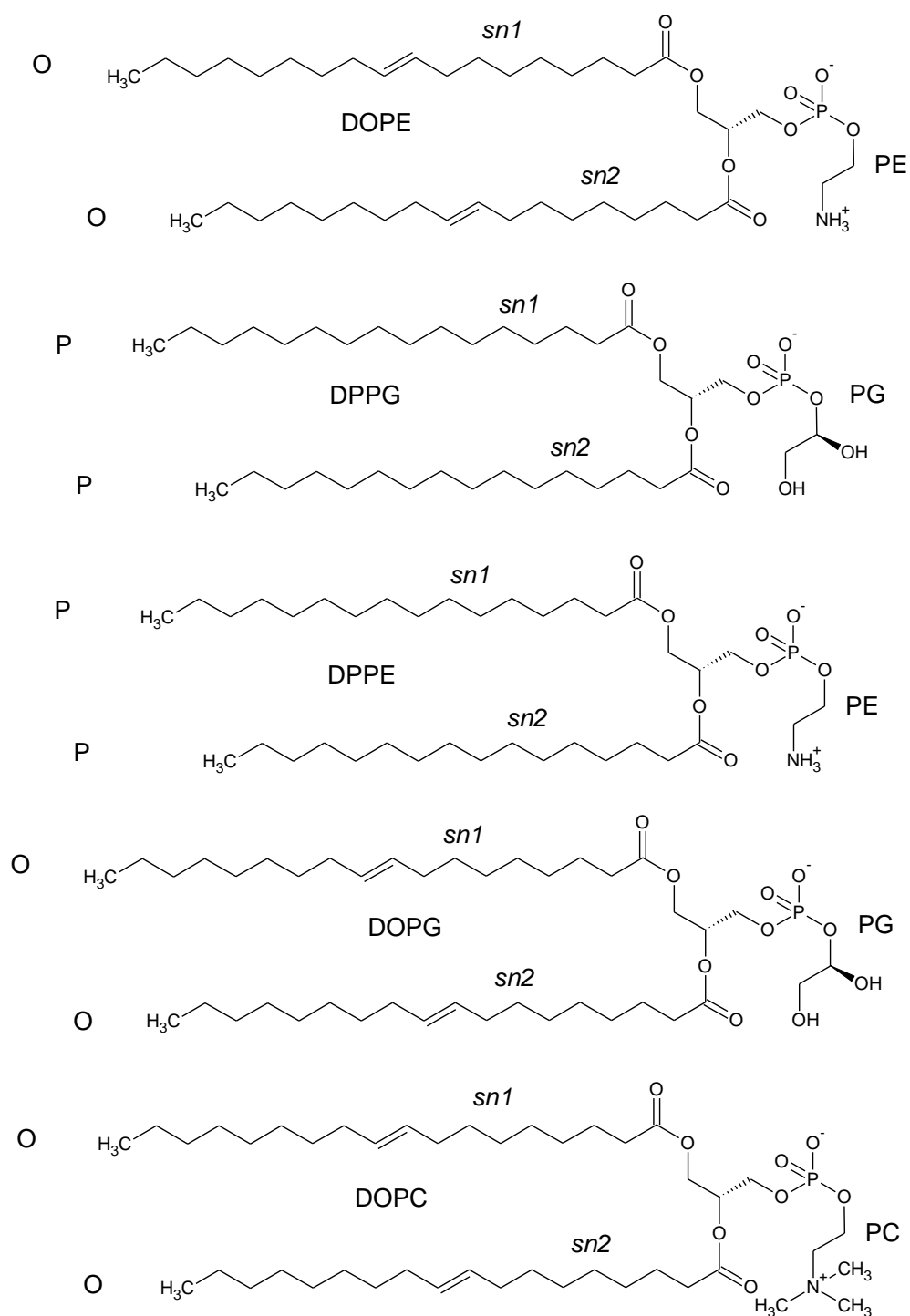


Figure S3.1. Molecular schemes of 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DPPE), 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol) (DOPG) and 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC).

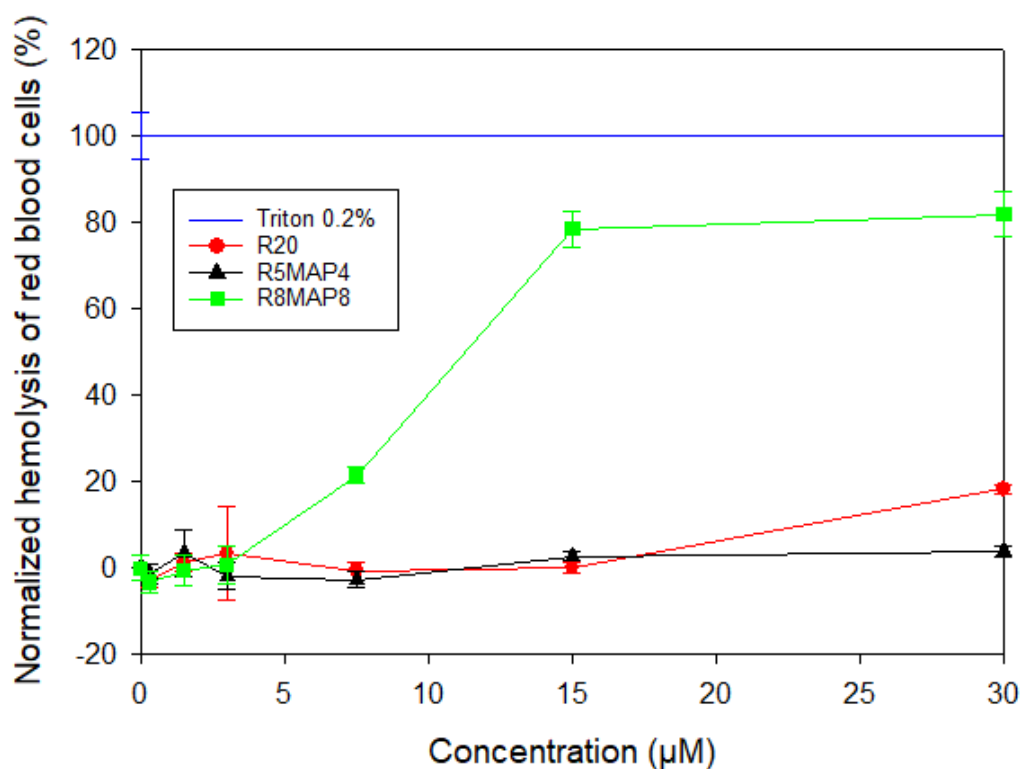


Figure S3.2. Percentage of hemolysis of a red blood cell population by the addition of various concentrations (μM) of R20, R5MAP4, R8MAP8. The results were normalized with a control in which red blood cells were placed in PBS. 100% of hemolysis was obtained with a control in which cells were treated with Triton 0.2%. The experiments were made three time in an independent manner.

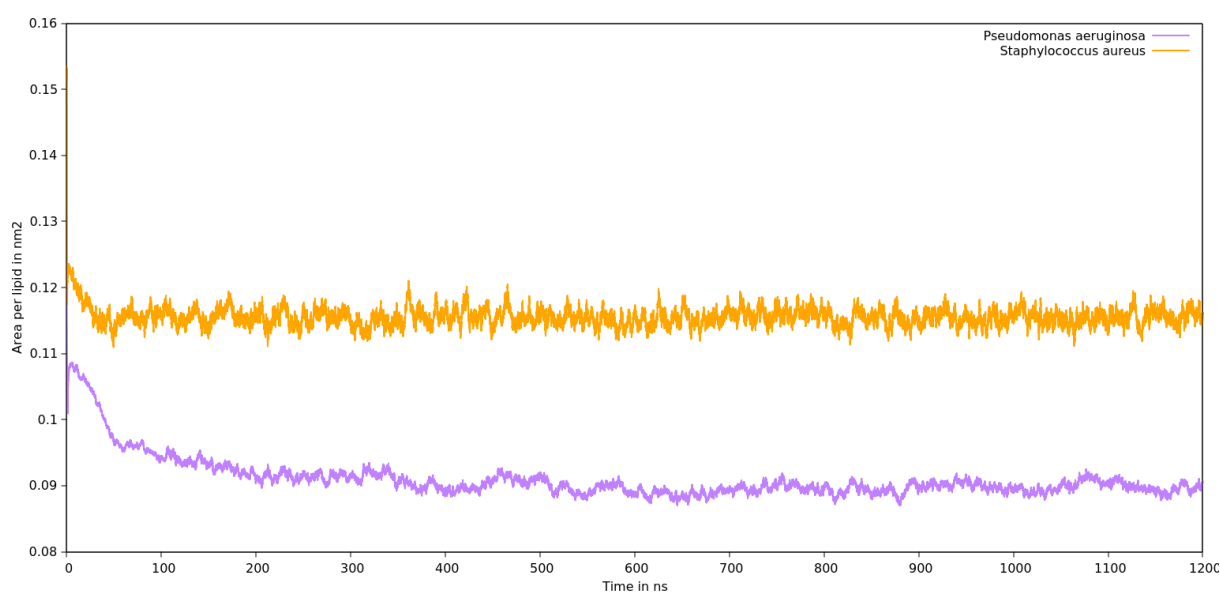


Figure S3.3. Area per lipid evolution for the PA (purple) and SA (orange) membranes alone.

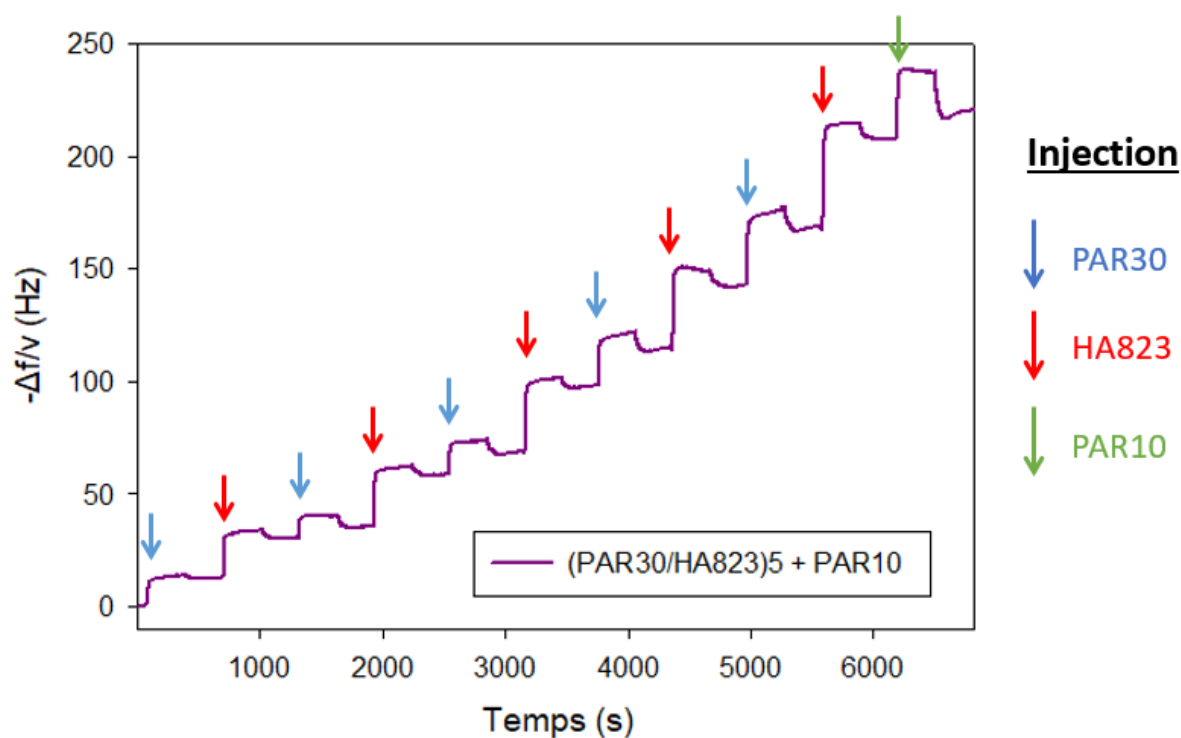


Figure S3.4. Suivi de la fréquence de vibration au cours du temps par QCM lors des dépôts successifs des polyélectrolytes. La première couche déposée est une couche de PAR30. Chaque dépôt de polyélectrolyte est suivi par un rinçage avec du tampon Tris 10 mM / NaCl 0.15 M à pH 7.4 (Tris / NaCl). Cinq bicouches PAR30 / HA sont formés, puis le peptide PAR10 est injecté. Un rinçage au tampon Tris / NaCl est effectué 5 minutes après l'injection du peptide.

Chapitre 4. Hydrogels antimicrobiens à base de poly(éthylène glycol) diacrylate et de ϵ -poly(L-lysine) pour la cicatrisation de plaies

Chapitre 4. Hydrogels antimicrobiens à base de poly(éthylène glycol) diacrylate et de ϵ -poly(L-lysine) pour la cicatrisation de plaie

4.1. Introduction	159
4.1.1. Choix des polymères	159
4.2. Hydrogels de poly(éthylène glycol) diacrylate et de ϵ-PLL aux propriétés antimicrobiennes intrinsèques.....	160
4.2.1. Abstract	161
4.2.2. Introduction	161
4.2.3. Materials and Methods	164
4.2.3.1. Materials	164
4.2.3.2. Preparation of hydrogels.....	164
4.2.3.3. Rheological properties	165
4.2.3.4. Degradation property and swelling properties	165
4.2.3.5. Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of ϵ -PLL	166
4.2.3.6. Antibacterial properties	166
4.2.3.7. Cytotoxic concentration of ϵ -PLL	167
4.2.3.8. <i>In vitro</i> cytotoxicity test.....	167
4.2.3.9. Evaluation of the pro- and anti-inflammatory properties of the extracted hydrogels	168
4.2.3.10. Antifungal properties of hydrogels.....	169
4.2.3.11. In vivo experiment	169
4.2.3.12. Statistical analysis	170
4.2.4. Results and discussion	171
4.2.4.1. Hydrogels formation	171
4.2.4.2. Rheological properties	172
4.2.4.3. Swelling percentage and degradation properties	173
4.2.4.4. MIC of ϵ -PLL determination	174
4.2.4.5. Antibacterial properties on Gram-positive and Gram-negative bacteria	175

4.2.4.6. Antibacterial activity of the degradation products of hydrogels	178
4.2.4.7. Determination of the cytotoxic concentration of ϵ -PLL.....	179
4.2.4.8. Biocompatibility.....	179
4.2.4.9. Antifungal activity of hydrogels	181
4.2.4.10. <i>In vivo</i> experiments.....	187
4.2.5. Conclusion	190
4.3. Résultats complémentaires	191
4.3.1. Réduction des fonctions acrylates par le TCEP	191
4.3.2. Mobilité des chaînes de ϵ -PLL dans le gel	193
4.3.3. Dosage des amines primaires dans les hydrogels.....	195
4.3.4. Evaluation de la capacité de migration de cellules au sein d'une « blessure » en présence d'extraits d'hydrogels	197
Références.....	201
Figures complémentaires	204

4.1. Introduction

Comme évoqué précédemment dans la partie introductive, les infections nosocomiales sont un problème majeur de santé publique. Ces infections sont majoritairement dues à l'utilisation de dispositifs médicaux qui, même s'ils sont stérilisés, ne permettent pas de prévenir toutes les infections. De plus, les bactéries induisant ces infections présentent de plus en plus de résistances aux antibiotiques. Il est donc nécessaire de trouver de nouveaux (bio)matériaux possédant des propriétés antimicrobiennes intrinsèques.

Parmi les matériaux prometteurs pour des applications biomédicales, figurent les hydrogels en raison de leur capacité à retenir une grande quantité d'eau dans leur réseau 3D. De plus, ils peuvent être facilement chargés avec des molécules actives. Ainsi, dans ce chapitre, nous décrirons le développement de nouveaux hydrogels aux propriétés antibactériennes intrinsèques.

Un grand nombre de publications décrivent la fabrication de biomatériaux basée sur la réaction de Michael à partir de poly(éthylène glycol) diacrylate (PEGDA) ^{1,2}. C'est le cas de Cao *et al.* qui ont développé un hydrogel antibactérien à base de PEGDA et de poly(hydrochlorure d'allylamine) (PAH) ³. Dans cette étude, le PEGDA et le PAH sont mélangés à 37°C pendant 4h jusqu'à gélification. Les hydrogels ainsi formés ont ensuite été placés au centre d'une gélose sur laquelle des bactéries *S. aureus* ont été préalablement ensemencées afin de mesurer la zone d'inhibition autour de l'hydrogel et ainsi évaluer ses propriétés antibactériennes. Ainsi, ces auteurs ont montré que l'hydrogel présentait des propriétés antibactériennes grâce à sa dégradation spontanée, mais aussi qu'il n'était pas toxique pour les cellules eucaryotes. De plus, l'hydrogel présente des propriétés adhésives et anti-adsorbantes intéressantes ce qui en fait un matériau prometteur comme adhésif pour des greffons de peau par exemple. Cependant, le PAH est un polymère synthétique qui est connu pour sa toxicité potentielle ce qui questionne sur son devenir à long terme dans l'organisme ⁴. A partir de ces observations, nous avons décidé de développer nos propres hydrogels à base de deux polymères : le PEGDA et la ϵ -poly(L-lysine) (ϵ -PLL).

4.1.1. Choix des polymères

Le poly(éthylène glycol) (PEG) est très utilisé pour le développement de dispositifs médicaux implantables ⁵. De plus, il possède des propriétés hydrophiles ce qui en fait un bon candidat pour le développement d'hydrogels. Enfin, il est également reconnu pour avoir des propriétés anti-adsorbantes (« antifouling » en anglais).

Le polymère qui était envisagé pour réagir avec le PEGDA lors de la synthèse de l'hydrogel (en remplacement du PAH utilisé par Cao *et al.*) était initialement la poly(L-arginine) (PAR). En effet, cet homopolymère est largement étudié au laboratoire notamment pour la construction de films multicouches ^{6, 7}. La PAR présente des propriétés antibactériennes vis-à-vis de nombreuses souches bactériennes, que ce soit des bactéries à Gram positif comme le *S. aureus* et à Gram négatif comme le *P. aeruginosa*. De plus, cette molécule est faiblement toxique ce qui permet de l'envisager dans le développement de biomatériaux. Enfin, elle possède une amine primaire en bout de chaîne mais aussi un groupement guanidine par monomère qui, à pH supérieur au pI de la PAR, c'est-à-dire à pH 9, est neutre et pourrait ainsi réagir avec les fonctions acrylates du PEGDA. En effet, les fonctions acrylates (accepteur de Michael) sont capables de réagir avec un nucléophile (donneur de Michael) par une réaction d'addition, dite addition de Michael. Le nucléophile doit être un groupement électroattracteur soit, dans notre cas, une fonction amine primaire non chargée.

Cependant, lors des premiers essais effectués, aucune gélification n'a pu être observée lorsque le PEGDA et la PAR ont été mélangés, et ce quelles que fussent les concentrations en polymères utilisées : les fonctions guanidines ne sont pas assez réactives pour permettre la formation de liaisons covalentes avec les fonctions PEGDA et la formation d'un réseau 3D. Ainsi, un autre polycation possédant des fonctions amines primaires sur chaque monomère de sa chaîne a été sélectionné : la ϵ -PLL.

La ϵ -PLL est déjà utilisée dans l'industrie alimentaire notamment en raison de ses propriétés antibactériennes et antifongiques ⁸. De plus, ce polymère est produit par la bactérie *Streptomyces albulus*, elle est biocompatible et peu onéreuse ⁹. Enfin, cet homopolymère présente un point isoélectrique supérieur au pH physiologique (également 9, comme celui de la PAR). Les fonctions amines peuvent donc réagir avec les acrylates du PEGDA à pH supérieur à 9, mais sont tout de même chargés à pH physiologique, ce qui permet de conserver les propriétés antibactériennes de la molécule.

4.2. Hydrogels de poly(éthylène glycol) diacrylate et de ϵ -PLL aux propriétés antimicrobiennes intrinsèques

Rédigé sous forme d'article pour une soumission prochaine

Hydrogels composed of ϵ -poly(L-lysine) and poly(ethylene glycol) diacrylate with tunable intrinsic antibacterial and antifungal properties

Eloïse Lebaudy, Skander Hathroubi, Benoit Frisch, Philippe Laval.

4.2.1. Abstract

Nosocomial infections caused by biomedical devices pose a significant problem as they result in implant failure and present a major concern for patients. Furthermore, the rising bacterial resistance to antibiotics necessitates the search for new solution to combat these infections. In this study, we developed hydrogels based on poly(ethylene glycol) diacrylate polymers and on a natural polypeptide, the ϵ -poly(L-lysine). These materials exhibit low cytotoxicity towards fibroblast cells and demonstrate potent antibacterial properties against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Our research reveals that this antimicrobial activity is released during the degradation of the hydrogels within the medium. Additionally, we demonstrated that the hydrogel surface prevents bacterial adhesion through contact-killing mechanism. Finally, we have successfully loaded the hydrogels with poly(L-arginine) of 10 arginine residues. This poly(L-arginine) exhibits robust antifungal properties, thereby introducing a novel feature to the hydrogels. Finally, to validate their effectiveness, *in vivo* experiment were conducted using a mouse model with a *S. aureus* infected wound. The hydrogels, poured into compresses, were utilized to treat the wounds. The results demonstrate a significant reduction in infection around the affected area.

4.2.2. Introduction

Daily, 1 in 31 hospital patients in the USA develops health-care associated infections (HAIs), according to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ¹⁰. The European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) reports that 16% of surgical procedure lead to infection in 2016 ¹¹. Medical devices (MDs) play a crucial role in the development of infectious diseases ¹². Both bacteria and fungi biofilms contribute to device-associated infections ^{13, 14}. The detachment of a biofilm on a medical device can lead to severe systemic infection, such as bacteremia and sepsis ¹⁵.

Thus, there is a search for innovative solutions aimed at reducing the risk of infection and proliferation of bacteria associated with medical devices. Moreover, since last decades, new issues concerning diabetics people are emerging as the number of people with this disease is increasing. Each year, more than 100 million of people are concerned by diabetic foot ulcers worldwide and 6% of these ulcers lead to infections and frequently to hospitalization ^{16, 17}. The risk of wound infections is higher for diabetic patients, and their wound healing process is a slower compared to that of normal patients. As a result, diabetic patients have a higher rate of complications, which can potentially lead to amputation or even death ^{18, 19}.

Although the use of antibiotics is currently the primary method for preventing and treating infections, it is not a sustainable long-term. Over time, bacteria can undergo mutations,

resulting in the emergence of antibiotic-resistant bacteria^{20, 21}. Thus, it is necessary to find new solutions to decrease the infection risk. The development of new materials that can be applied onto medical devices, implantable or not, with an intrinsic antimicrobial activity could be an interesting solution. Among the different kind of materials, hydrogels are promising materials for medical applications. Hydrogels are composed of a hydrophilic 3D network and their broad range of properties allow their adaptation to various applications²². First, hydrogels are largely studied as carrier to release active components, such as antibiotics or anti-inflammatory molecules²³⁻²⁵. Then, hydrogels can be interesting for dressing applications as the hydrophilic properties of hydrogels promote a good environment for wound healing^{26, 27}.

Poly(ethylene glycol) (PEG) is highly used for the development of hydrogels in biomedical applications. Due to its good solubility in water, its high capacity to retain water and its biocompatibility, PEG has been used as carrier for the release of active components and also for tissue regeneration applications²⁸⁻³⁰. Cao *et al.* developed a hydrogel based on poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) and poly(allylamine hydrochloride) (PAH) that presented antimicrobial properties³. Moreover, these hydrogels presented strong adhesive properties, antimicrobial activity thanks to PAH and spontaneous degradability. However, PAH, the synthetic cationic polymer conferring antibacterial properties to the hydrogel, is known for its cytotoxicity that can impede its use in hydrogels for medical applications⁴. The cytotoxicity of the materials will kill the cells around it which can lead to the implant failure.

The objective of this study was to develop hydrogels by combining natural-derived molecules with PEG, with the aim of functionalizing the hydrogels to possess desired properties. For this purpose, poly(L-arginine) (PAR) a cationic polypeptide highly studied in our lab, could be an ideal candidate to build hydrogels in combination with PEGDA^{7, 31}. PAR presents a potent antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria with no bacterial resistance in long run. Notably, PAR effectively inhibits the growth of antibiotic-resistant bacteria such as MRSA (methicillin resistant staphylococcus aureus)⁷. Other polyelectrolytes, more precisely poly cations, are studied for their antimicrobial properties.

Among these polycations, α -poly(L-lysine) (α -PLL) stands out as potentially compelling choice for hydrogel formation with PEGDA. This is due to its antimicrobial properties and presence of amine functional groups. However, it should be noted that α -PLL is not entirely natural; and its high cost poses limitations on its widespread utilization³².

On the other hand, with a structure close to α -PLL, ϵ -poly(L-lysine) (ϵ -PLL) is a natural polymer produced by *Streptomyces* bacteria and is highly used in food industry because of its non-toxic nature and its remarkable antifungal and antibacterial properties³³⁻³⁵. These

attributes make ϵ -PLL polymer a compelling candidate for a potential application in the realm of medical devices, and more precisely in the development of antibacterial hydrogels ³⁶.

In the present study, we focused on the development of new hydrogels composed of ϵ -PLL and PEGDA, cross-linked through reactivity of diacrylate functions of PEGDA with primary amine of ϵ -PLL (**Figure 4.1.**). The objective was to develop hydrogels easy to produce, exhibit potent antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, and demonstrate complete biocompatibility. The antibacterial activity was achieved through contact-killing effect and the controlled degradation of the hydrogel, leading to the release of the ϵ -PLL. To enhance biocompatibility, an additional step was undertaken to reduce the acrylate functions in the hydrogel. Furthermore, by varying the concentrations and ratios of the two polymers, we were able to modify the mechanical properties of materials. Notably, hydrogels have the ability to incorporate various molecules including those with antifungal properties, prior gelation, thereby impacting new and intriguing characteristics to the material. Collectively, these simultaneous properties hold promise for the utilization of these hydrogels in diver medical applications.

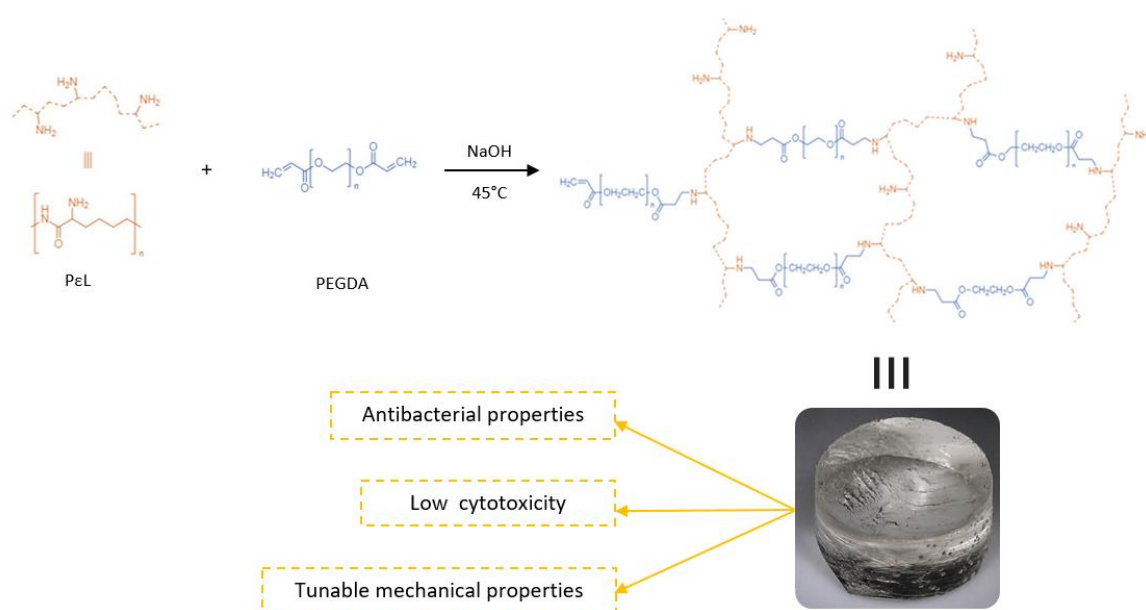


Figure 4.1. Hydrogels based on ϵ -PLL and PEGDA synthesis. The two polymers are mixed together under basic pH to deprotonate amine functions. Then, the reactive mixture is heated at 45 °C for 2 h in order to initiate the crosslinking. The developed hydrogels are transparent and present strong antibacterial properties, low toxicity and tunable mechanical properties.

4.2.3. Materials and Methods

4.2.3.1. Materials

ϵ -poly(L-lysine) hydrochloride (ϵ -PLL) with a molecular weight between 3 500 and 4 500 Da was purchased from Biosynth Carbosynth (United Kingdom). Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris) was purchased from Serva (Germany). Poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA), Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP), sodium hydroxide (NaOH), thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), mineral oil, Mueller Hinton broth (MHB), Brain Heart Infusion broth (BHIB), lipopolysaccharide (LPS), Griess reagent were purchased from Merck (Germany). Poly(L-arginine) with 10 and 30 residues of arginine (PAR10 and PAR30) were purchased from Alamanda Polymers (United States). Dimethyl Sulfoxide (DMSO) was purchased from Millipore Sigma (Germany). Paraformaldehyde was purchased from Fischer Scientific (United States). Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose (DMEM-HG), Phosphate-buffered saline (PBS), Fetal Bovine Serum (FBS) and penicillin-streptomycin (PS) were purchased from Biowest (United States). Interleukin-4 (IL-4) was purchased from Abcam (United Kingdom). CTC and SYTO®24 kits were purchased from ThermoFischer Scientific (United States).

4.2.3.2. Preparation of hydrogels

Hydrogels were prepared as followed. PEGDA was diluted in ultrapure water ($\rho = 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) and ϵ -PLL was dissolved in a NaOH 0.15 M solution. Concentrations of both polymers were varied between $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $500 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ for testing different conditions of hydrogels. Then, both polymers were mixed in equivalent volume ratio (final concentration of NaOH was 0.075 M), briefly agitated and the reacting mixture was incubated for 2 h at 45 °C in order to increase the kinetic of the reaction between acrylates and amines. After 2 h, hydrogels were left at room temperature for 30 minutes. The hydrogels were rinsed with a first step performed with 500 μL of TCEP at $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in Tris 10 mM / NaCl 0.15 M pH 7.4 buffer (Tris/NaCl) for 4 h under stirring. Then, the hydrogels were washed two times with 500 μL Tris/NaCl: one fast one-minute rinsing step and one long one-h rinsing step. Finally, materials were sterilized under UV light for 20 minutes.

For the *in vivo* experiment and the related *in vitro* experiment, the hydrogels are prepared as below. Pieces of compresses (Medicomp Hartmann, France) measuring 1 cm^2 were cut and 200 μL of mixed ϵ -PLL/PEGDA solution were poured inside. Then, the compresses were placed at 45 °C for 2 h for gelation of the hydrogel. Finally, the samples were rinsed with 500 μL of TCEP at $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 4 h and then 2 times with Tris/NaCl buffer (one minute rinsing step and 1 h rinsing step).

4.2.3.3. Rheological properties

Rheological measurements were done with a cone-plate geometry (d=40 mm) on a Kinexus Ultra rheometer (Malvern, United Kingdom). 700 µL of each polymer (PEGDA and ε-PLL) were mixed and 1.4 mL was deposited onto the plate of the rheometer. The frequency was fixed at 1 Hz and the strain at 1 %. The plate was heated at 45 °C. Then, the elastic modulus (G'), the viscous modulus (G'') and the phase angle (determined as arctan(G''/G')) were monitored for 2 h in order to determine the gelation point and the elastic modulus of hydrogels.

4.2.3.4. Degradation property and swelling properties

To determine the degradation rate (T_{deg}) and the swelling percentage (Sw) of our materials, the hydration ratio ($T_{hydration}$) of the hydrogels was quantified first. The hydrogels were prepared in 2 mL syringes as described previously. Then, the hydrogels were removed from the syringes and cut in small disc of about 200 mg. These small hydrogel discs were weighed just after the gelation process (m_{gel}). Then, they were dried at 37 °C for 24 h and weighed a second time (m_{dried}). The hydration ratio was determined as followed:

$T_{hydration} = \frac{m_{gel} - m_{sec}}{m_{gel}} \times 100$, with m_{gel} the mass of the hydrogel after gelation and m_{sec} the mass of the dried hydrogel.

In order to determine the degradation rate of the hydrogels, freshly prepared hydrogels were weighed (m_{gel}) and then immersed in PBS for 24 h before being dried and weighted a second time (m_f). The degradation property was determined by the weight loss percentage as:

$T_{deg} (\%) = \frac{(m_{gel} - T_{hydration} \times m_{gel}) - m_f}{(m_{gel} - T_{hydration} \times m_{gel})} \times 100$; with m_{gel} the mass of the hydrogel after gelation process, m_f the final mass after incubation in PBS for 24 h and $T_{hydration}$ the hydration ratio of the prepared hydrogels.

For the determination of the swelling percentage (Sw), the hydrogel discs were weighed after the gelation process (m_{gel}) and incubated for 24 h in PBS at 37°C. No rinsing or dried steps were performed between the gelation process and the weighing. Then, the hydrated samples were weighed ($m_{hydrated}$). The swelling percentage is calculated with the following equation, taking into account the degradation rate and the hydration rate:

$Sw (\%) = \frac{m_{hydrated} - ((m_{gel} - T_{hydration} \times m_{gel}) - (\frac{T_{deg}}{100} \times (m_{gel} - T_{hydration} \times m_{gel})))}{(m_{gel} - T_{hydration} \times m_{gel}) - (\frac{T_{deg}}{100} \times (m_{gel} - T_{hydration} \times m_{gel}))} \times 100$; with m_{gel} the

mass of hydrogel after the gelation, $m_{hydrated}$ the mass of hydrogel after swelling in PBS for 24 h, $T_{hydration}$ the hydration ratio of the prepared hydrogel and T_{deg} the degradation rate of the hydrogels after 24 h in PBS.

4.2.3.5. Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of ϵ -PLL

First, MICs of ϵ -PLL on *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) was determined. Briefly, bacteria were pre-cultured by adding an isolated colony in 10 mL Mueller Hinton Broth (MHB) for 5 to 7 h at 37 °C. These bacteria pre-cultures were then diluted in MHB in order to obtain a concentration of 8×10^5 CFU.mL⁻¹ (Colony Forming Unit per mL). Solutions at various ϵ -PLL concentrations were prepared in PBS. In 96 well-plates, 90 μ L of bacteria diluted at a concentration of 8×10^5 CFU.mL⁻¹ in MHB were poured and 10 μ L of ϵ -PLL at the different concentrations were added. Triplicates for each concentration were prepared. After being incubated for 24 h at 37 °C under stirring, optical densities at 595 nm (OD_{595nm}) of each well were measured.

Then, the MIC of ϵ -PLL and PAR10 were determined on *C. albicans* ATCC 18804. For this experiment, the same procedure than described before was followed, except for the culture medium that was replaced by Sabouraud broth (SAB).

4.2.3.6. Antibacterial properties

Antibacterial activity of our materials was studied on different Gram-positive (*S. aureus* ATCC 25923 and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)) and Gram-negative bacteria (*P. aeruginosa* ATCC 27853 and *E. coli* ATCC 25922).

4.2.3.6.1. Antibacterial activity for hydrogels in contact with bacteria

For antibacterial tests for hydrogels in contact with bacteria, 200 μ L of hydrogels were prepared by pouring 200 μ L of ϵ -PLL/PEGDA (1/1 in v/v) solutions in 24-well plates closed with a sealed film during the gelation. Then, 500 μ L of bacteria pre-cultured at 8×10^5 CFU.mL⁻¹ were added into 24-well plates containing 200 μ L of hydrogels, previously prepared and sterilized under UV light for 20 minutes. After being incubated for 24 h at 37 °C under stirring, the supernatant was removed and placed in the well of a 96-well plates and its OD_{595nm} was measured.

4.2.3.6.2. Surface characterization with confocal microscopy

The bacteria at the surface of hydrogels were stained at the end of the antimicrobial test in order to visualize their adhesion on the hydrogels surface. The nucleic acids were stained with Syto®24 dye and respiratory activity of bacteria was monitored using 5-Cyano-2,3-ditolyl-tetrazolium chloride (CTC) dye. Then, bacteria were fixed with 4 % paraformaldehyde in PBS. Bacteria were observed by confocal microscopy at two different wavelengths ($\lambda_{ex} = 488$ nm / $\lambda_{em} = 520$ nm and $\lambda_{ex} = 561$ nm / $\lambda_{em} = 591$ nm) with a Zeiss LSM 710 microscope (Heidelberg, Germany) using x63 Plan Apo (1.4 NA) oil objective purchased from Zeiss (Heidelberg, Germany).

4.2.3.6.3. Antibacterial activity of the extracted hydrogels

To determine if the antibacterial activity of hydrogels was related to a contact killing mechanism or if it is more related to a release mechanism (*i.e.* the antibacterial components were released by the hydrogel during the degradation), the antibacterial activity of the extracted material was tested as follow. Hydrogels with a volume of 200 μL were poured in 24-well plates. After the rinsing and the sterilized steps, 500 μL of MHB were added in each well for 24 h at 37 °C. After 24 h, 270 μL of medium extract from each well of the 24-well plates were placed in 48-well plates and 30 μL of bacteria diluted at $8 \times 10^6 \text{ CFU.mL}^{-1}$ were added. The plates were then incubated for 24 h at 37 °C under stirring. Finally, the $\text{OD}_{595\text{nm}}$ was measured in each well.

4.2.3.7. Cytotoxic concentration of ϵ -PLL

The cytotoxic concentration of ϵ -PLL was determined on BALB/3T3 fibroblasts. BALB/3T3 cells were cultured in high glucose DMEM medium with 10% of Fetal Bovine Serum (FBS) and 1 % of penicillin-streptomycin (PS) (DMEM+). A range of solutions at various ϵ -PLL concentrations were prepared in PBS. Then, 10 μL of ϵ -PLL solutions at the different concentrations were diluted with 90 μL of DMEM+ medium and then 100 μL of this resulting solution were poured onto 80 % confluent cells. After 24 h at 37 °C, the medium was removed and replaced with 100 μL of MTT solution at a concentration of 0.2 mg.mL^{-1} diluted in cell culture medium. The plate was incubated for 3 h at 37 °C and then the formazan produced was dissolved with 100 μL of DMSO under a hood. Finally, absorbance of each solution was measured at 570 nm using a Xenius XC spectrophotometer (SAFAS, Monaco).

4.2.3.8. In vitro cytotoxicity test

In vitro cytotoxicity of hydrogels were performed on BALB/3T3 fibroblasts cells. Direct cytotoxicity and tests on extracts were evaluated following ISO 10993-5 standard with both cell types. BALB/3T3 cells were cultured in DMEM-HG with 10% of FBS and 1% of PS.

4.2.3.8.1. Direct cytotoxicity

Direct cytotoxicity test was performed in 24 well-plates according to a reported protocol ³¹. In each well, 60 000 BALB/3T3 cells were cultured for 24 h at 37°C with 500 μL of medium. Freshly gelled hydrogels that were previously prepared in 2 mL syringes were weighed just after the gelation process. Hydrogels with a weight of 25 mg were used for direct cytotoxicity test. Hydrogels were first rinsed with TCEP and Tris / NaCl buffer as previously reported and were then sterilized during 20 minutes under UV light and placed onto the 80 % confluent cells. After 24 h at 37 °C, all hydrogels were completely dissolved in the medium. The medium was removed and replaced with 500 μL of MTT solution at a concentration of 0.2 mg.mL^{-1} diluted in cell culture medium. This solution was incubated for 3 h at 37°C and then the formazan that

was produced was dissolved with 500 μL of DMSO. Finally, absorbance of each solution was measured at 570 nm using a Xenius XC spectrophotometer (SAFAS, Monaco).

4.2.3.8.2. Tests on extracts

Freshly gelled hydrogels, weighing 25 mg, were rinsed according to the protocol previously explained. The rinsing process involved sequential steps, beginning with TCEP followed by Tris/NaCl buffer. After rinsing, the hydrogels were transferred to 24-well plates containing 1 mL of cell culture medium, and incubated 24 h at 37 °C to facilitate extraction. The resulting extract solutions obtained from hydrogel were then diluted to different concentrations (12.5, 25, 50 and 100 %) using culture medium. In parallel, 6 000 BALB/3T3 cells were seeded in 96 well-plates and allowed to incubate at 37°C for 24 h in 100 μL of culture medium per well. Subsequently, the culture medium was replaced by the extracted solutions at concentration of 12.5, 25, 50 and 100 %. After 24-hour incubation at 37 °C, the medium was removed, and 100 μL of MTT solution, with a concentration of 0.2 mg.mL⁻¹ diluted in cell culture medium, was added. The plate was then incubated at 37 °C for 3 h. Following incubation, the formazan formed was dissolved by adding 100 μL of DMSO to each well, and the absorbance was measured at 570 nm using a Xenius XC spectrophotometer (SAFAS, Monaco).

4.2.3.9. Evaluation of the pro- and anti-inflammatory properties of the extracted hydrogels

The pro- and anti-inflammatory properties on RAW 264.7 murine macrophages of the supernatant in which the hydrogels were extracted were evaluated by the quantification of the nitric oxide (NO) using Griess-Saville method according to a reported protocol ³⁷. RAW 264.7 cells were cultured in DMEM medium with 5 % of low endotoxin FBS and 1% of PS. First, freshly gelled hydrogels, weighing 25 mg, were rinsed according to the protocol previously explained. The rinsing process involved sequential steps, beginning with TCEP followed by Tris/NaCl buffer. After rinsing, the hydrogels were transferred to 24-well plates containing 1 mL of cell culture medium, and incubated 24 h at 37°C. Besides, 5 x 10⁵ of RAW 264.7 macrophages were seeded in 24 well plates and incubated for 24 h at 37°C. After 24 h, 500 μL of the extracted hydrogels were poured to the 80 % confluent adhered cells. LPS or IL-4 was also added at a final concentration of 10 ng.mL⁻¹ to induce macrophage polarization to M1 pro-inflammatory phenotype. Different controls were prepared in parallel. First, 500 μL of “pure” cell medium was poured to the macrophage cells. Cell culture medium in which LPS or IL-4 at a concentration of 10 ng.mL⁻¹ was added was also poured on cells. The cells were then incubated at 37°C for 24 h. After 24 h of treatment, 100 μL of the supernatants were transferred into 96-well plates. 100 μL of 10 % acetic acid (pH 2.5) and 50 μL of Griess reagent at

6 mg.mL⁻¹ in ultrapure water were then added. The plate was placed under stirring for 15 minutes at room temperature and the absorbance of each well was read at 570 nm.

4.2.3.10. Antifungal properties of hydrogels

In order to improve the properties of the hydrogels, poly(L-arginine) of ten arginine residues (PAR10) was added into the materials before the gelation point. Thus, 200 µL of mixed ε-PLL/PEGDA were poured into 24-well plates and 25 µL of PAR10 at 10 mg.mL⁻¹ in ultrapure water ($\rho = 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) were added. The plates were put at 45 °C for 2 h for gelation. Finally, hydrogels were rinsed with a first step performed with 500 µL of TCEP at 5 mg.mL⁻¹ in Tris 10 mM / NaCl 0.15 M pH 7.4 buffer (Tris/NaCl) for 4 h under stirring. Then, the hydrogels were washed two times with 500 µL Tris/NaCl: one fast one-minute rinsing step and one long one-hour rinsing step. Finally, materials were sterilized under UV light for 20 minutes.

Rheological properties, antimicrobial properties on *S. aureus* ATCC 25923, MRSA, *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853, and cytotoxicity of these new materials on BALB/3T3 fibroblasts were studied as before, with the same procedures. Moreover, the antifungal activity was tested on *C. albicans* (ATCC 18804) in Sabouraud medium (SAB). The same procedure than for the antimicrobial activity was followed. Briefly, 500 µL of fungi pre-cultures at $8 \times 10^5 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ were added into 24-well plates containing hydrogels. The plates were incubated for 24 h at 37 °C under stirring. Finally, the OD_{595nm} of the supernatant from each well was measured.

4.2.3.11. In vivo experiment

For the *in vivo* experiment, hydrogels prepared in compresses (as reported previously) are used. All the *in vivo* experiments were performed by C.RIS Pharma (France) (except the histopathological analyses that were performed by Anapath (Switzerland)).

For these experiments, 7 mice were used for each condition. Mice were clipped and shaved off on back under isoflurane anaesthesia. Subcutaneous injections of buprenorphine (0.05 mg.kg⁻¹) were administrated for analgesia. A wounding site of approximately 1 cm² was identified on the back of each mouse (1 site per animal). The skin was wounded by stripping the adhesive band (Tensoplast) 10 times, resulting in a red and glistening tissue. A new adhesive band was used for each stripping occurrence.

On the wounding site of each mouse, infection with methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) (10 µL, $10^7 \text{ CFU}\cdot\text{wound}^{-1}$) was performed by using sterile inoculator. A first group included not treated mice was prepared as a negative control. The second group was prepared by treating the mice wound by topic application of 35 µL of Bactroban (balm containing 2 % of mupirocin)

at 6 h, 24 h and 30 h after infection. For the samples, the two group were treated by application of the hydrogel poured in compresses at 24 h after the infection. Three days after the treatment with our materials, the mice were sacrificed.

At sacrifice, one half of skin was biopsied by using a biopsy punch (6 mm). Skin biopsies were collected in sterile tube (GentleMACS) and weighted. They were stored for a maximum of 96 h between 0 °C and 10 °C before homogenization. Next, it was pre-cut and grinded in 500 µL of PBS and plated on agar plates for CFU counting. To determine the concentration of the bacterial in skin, the skin solution was diluted at 1/10 in PBS-0.5 % Tween 20 in deep wells.

Histopathological analyses were performed by Anapath (Switzerland). Tissues were trimmed, dehydrated, embedded in paraffin, cut at a nominal thickness of approximately 2-4 micrometres, mounted on glass slides, and stained with haematoxylin and eosin (H&E), Gomori and Picro-sirius colorations according to the Test Site standard operating procedures. Histopathological evaluation of the stained sections was performed by light microscopy. Data were entered using an electronic IT system (Acenstos).

Then, seeding on Tryptic Soy Agar plate containing 4 µg.mL⁻¹ of Gentamicin and 2.5 ng.mL⁻¹ of Amphotericin B be performed and plate was placed at 37 °C overnight. Colonies were counted to determine the CFU, and dilution was adapted for each animal to have approximately 0 to 200 colonies counted per animal. The number of colonies per mg of skin was determined.

Besides, a minimum of 1 mL of blood was collected from mice by intracardiac puncture under isoflurane anaesthesia. Blood was placed in clot activator tubes for serum preparation. Serum samples were prepared and were aliquoted and stored at -20°C until their use for cytokines dosage. Moreover, the bio-plex mouse cytokine 6-plex Th17 kit is a magnetic bead-based immunoassays for the detection and measurement of the levels of biomarkers in diverse matrices such as serum, plasma, and tissue culture supernatants. This multiplex assay detects: IL-1β, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN-γ and TNF-α.

A quantitative ELISA mouse VEGF immunoassay (a solid-phase sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)) was also used to detect and quantify the level of mouse VEGF in serum, plasma and cell culture supernatants.

4.2.3.12. Statistical analysis

Each experiment was performed at least three times in same conditions. The data were analysed using SigmaPlot (Systat Software Inc, United States). Mean value and standard error of the mean were represented on the figures. One-way ANOVA on Ranks was performed for statistical significance.

4.2.4. Results and discussion

4.2.4.1. Hydrogels formation

Initially, an attempt was made to create hydrogels by mixing PEGDA and PAR30 under basic pH conditions. The intention was to utilize the reaction between the acrylate functions and the amines of the guanidine functions of PAR30. However, no hydrogel formation was observed. This can be attributed to the limited reactivity of the guanidine functions on the lateral chain of arginine with the acrylate functions of PEGDA. The reactivity of guanidine functions is lower compared to primary amine functions, which led to the decision of using ϵ -PLL instead of PAR30 for the development of the hydrogels.

The two polymers (ϵ -PLL and PEGDA) were mixed in 1/1 ratio in volume under basic medium. First, different formulations were tested by tuning ϵ -PLL and PEGDA concentrations (concentrations between 50 and 500 mg.mL⁻¹) and ratio between acrylate functions and amine functions (between 0.6 and 14.4) (**Table 4.1.**). After 2 h at 45 °C, only the condition with the lowest ratio between reactive functions (amine/acrylate = 0.6) did not form a hydrogel.

Thus, the concentration of both polymers has to be high enough to develop a hydrogel (at least 50 mg.mL⁻¹ for PEGDA and 100 mg.mL⁻¹ for ϵ -PLL). Moreover, a large range of ratio between amine and acrylate can lead to the development of a hydrogel (in this study, between 0.7 and 14.4).

Preliminary experiments were conducted to evaluate the antimicrobial properties of all the developed hydrogel formulations. For practical reasons, we focused on studying two hydrogels with different ratio between acrylate and amine functions. Our attention was directed towards condition 8, referred as ϵ -PLL/PEGDA-3.6 hydrogels (ratio between amine and acrylate functions equal to 3.6), and condition 13, referred ϵ -PLL/PEGDA-0.7 (ratio between amine and acrylate functions equal to 0.7). These two hydrogels demonstrated the most promising antibacterial properties in the preliminary experiments. Moreover, the hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-3.6 presented more amine functions than acrylate functions, whereas the ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogel exhibited more acrylate functions. Thus, by examining these two hydrogels, we were able to assess the impact of an excess of acrylate functions versus an excess of amine function.

Table 4.1. The different conditions of hydrogels tested by varying concentrations of polymers and ratio between acrylate and amines. The concentration of ϵ -PLL varied between 50 and 500 mg.mL⁻¹ and the concentration of PEGDA varied between 50 and 500 mg.mL⁻¹. Gelation of hydrogels was tested for ratio between acrylate and amine from 0.6 to 14.4.

Condition Number	Concentration PEGDA (mg.mL ⁻¹)	Concentration ϵ -PLL (mg.mL ⁻¹)	Ratio amine / acrylate	Gélification
1	200	50	0.6	no
2		100	1.2	yes
3		200	2.4	yes
4		400	4.8	yes
5		500	6.0	yes
6	50	300	14.4	yes
7	100		7.2	yes
8 (ϵ -PLL/PEGDA-3.6)	200		3.6	yes
9	350		2.1	yes
10	500		1.4	yes
11	100	100	2.4	yes
12		500	12	yes
13 (ϵ -PLL/PEGDA-0.7)	350	100	0.7	yes
14		500	3.4	yes

4.2.4.2. Rheological properties

The malleability and the hardness of hydrogels was different as the polymer concentrations and the ratio between reactive functions changed. ϵ -PLL/PEGDA-3.6 is more brittle but more malleable than ϵ -PLL/PEGDA-0.7. To determine the elastic modulus of both hydrogels and their gelation point, rheological experiment was done. Phase angle, elastic and viscous modulus was followed under time to determine the gelation point of those two conditions. The gelation point was reached when the phase angle was equal to 45 ° (or when the elastic modulus became higher than the viscous modulus). The gelation point of ϵ -PLL/PEGDA-3.6 was reached after 30 min (**Table 4.2.**). For ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogel, the gelation point was reached after 45 min. Fifteen minutes after the gelation point, the elastic modulus of ϵ -PLL/PEGDA-3.6 hydrogel was 8-9 times higher than the elastic modulus of ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogel (around 5 000 Pa for ϵ -PLL/PEGDA-3.6 hydrogel and 700 Pa for ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogel). This is probably due to the excess of amine functions in the ϵ -PLL/PEGDA-3.6 hydrogels which enables to increase the crosslinking network density of the hydrogel.

Thus, we produced two different hydrogels in term of mechanical properties. Gelation point and elastic modulus can be modulated by modifying the ratio between acrylate and amine functions and the concentration of both polymers.

Table 4.2. Gelation point of both ϵ -PLL / PEGDA-3.6 and ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogels determined by rheological measurement. The elastic modulus G' and the viscous modulus G'' were measured during all the experiment under a single frequency of 1 Hz and constant strain of 1 %. The gelation point was determined as the time when $G' = G''$. Finally, the elastic modulus 15 minutes after the gelation point was measured.

	Elastic modulus G'	Gelation Point
ϵ -PLL/PEGDA-3,6	Around 5 000 Pa	30 minutes
ϵ -PLL/PEGDA-0,7	Around 700 Pa	45 minutes

4.2.4.3. Swelling percentage and degradation properties

The stability of the two hydrogels (ϵ -PLL/PEGDA-3.6 and ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogels) was studied by quantifying their degradation in PBS medium after 24 h (**Figure 4.2.A**). Indeed, the bonds created between acrylate and amine functions can be easily hydrolysed in aqueous medium^{38, 39}. The degradation of ϵ -PLL/PEGDA-0.7 was 8 times faster than the degradation of ϵ -PLL/PEGDA-3.6 with a degradation of 2 ± 4 % for the hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-3.6 and a degradation of 25 ± 4 % for the hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-0.7.

The swelling properties of the hydrogels were also studied in PBS by successive weighing technique. The results showed swelling percentage between 700 and 900% in PBS, with a swelling of 832 ± 22 % for ϵ -PLL/PEGDA-3.6 hydrogel and of 749 ± 11 % for ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogel (**Figure 4.2.B**).

Polymers concentrations in hydrogel and ratio between reactive functions were directly linked to the mechanical properties. Indeed, we observed with the rheological study that the elastic modulus of ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogel is 8 to 9 times lower than the elastic modulus of ϵ -PLL/PEGDA-3.6 hydrogel. This means that the ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogel is less crosslinked than the other one. Thus, its stability is very low compared to the ϵ -PLL/PEGDA-3.6 hydrogel.

The degradation rate of hydrogels could be directly related to the release of ϵ -PLL, the antimicrobial polymer. The antibacterial properties of the hydrogels were thus assessing in the next section.

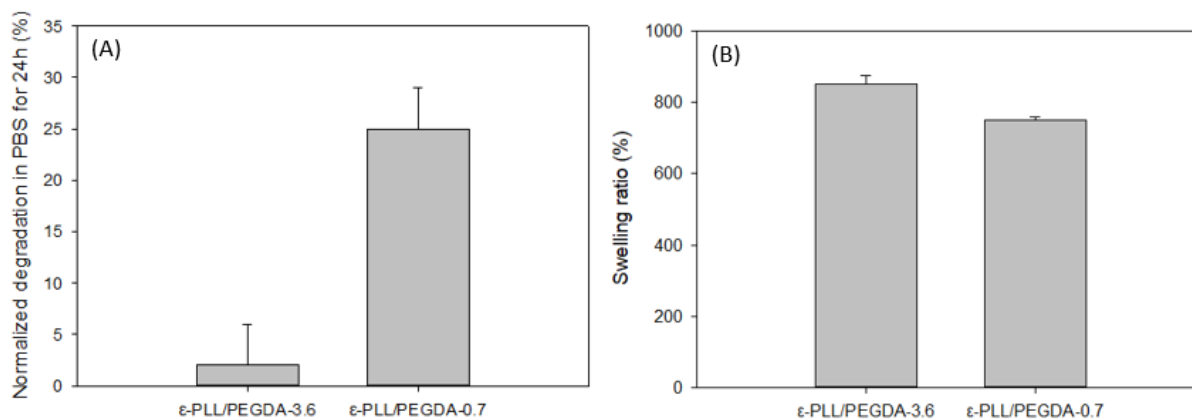


Figure 4.2. Degradation rate of the hydrogels after 24 h in PBS (A) and swelling ratio of the hydrogels in PBS (B). Both degradation rate and swelling ratio were determined by successive weighing. The graph represents averages and error bars represent standard error of the mean.

4.2.4.4. MIC of ϵ -PLL determination

First, Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of ϵ -PLL on different Gram-positive and Gram-negative bacteria were determined by the measurement of the OD_{595nm} after 24 h of incubation (**Figure 4.3.**). The MIC is determined as the lowest concentration of peptide necessary to inhibit completely the bacteria growth. The results show that the MIC of ϵ -PLL is $7.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ on *S. aureus* and *E. coli* strains. However, to efficiently inhibit MRSA strain, the concentration of the ϵ -PLL needs to be at least $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, while for *P. aeruginosa*, a concentration higher than $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ is necessary. This implies that in order to obtain hydrogels with antimicrobial properties, the concentration of free ϵ -PLL should exceed these threshold values.

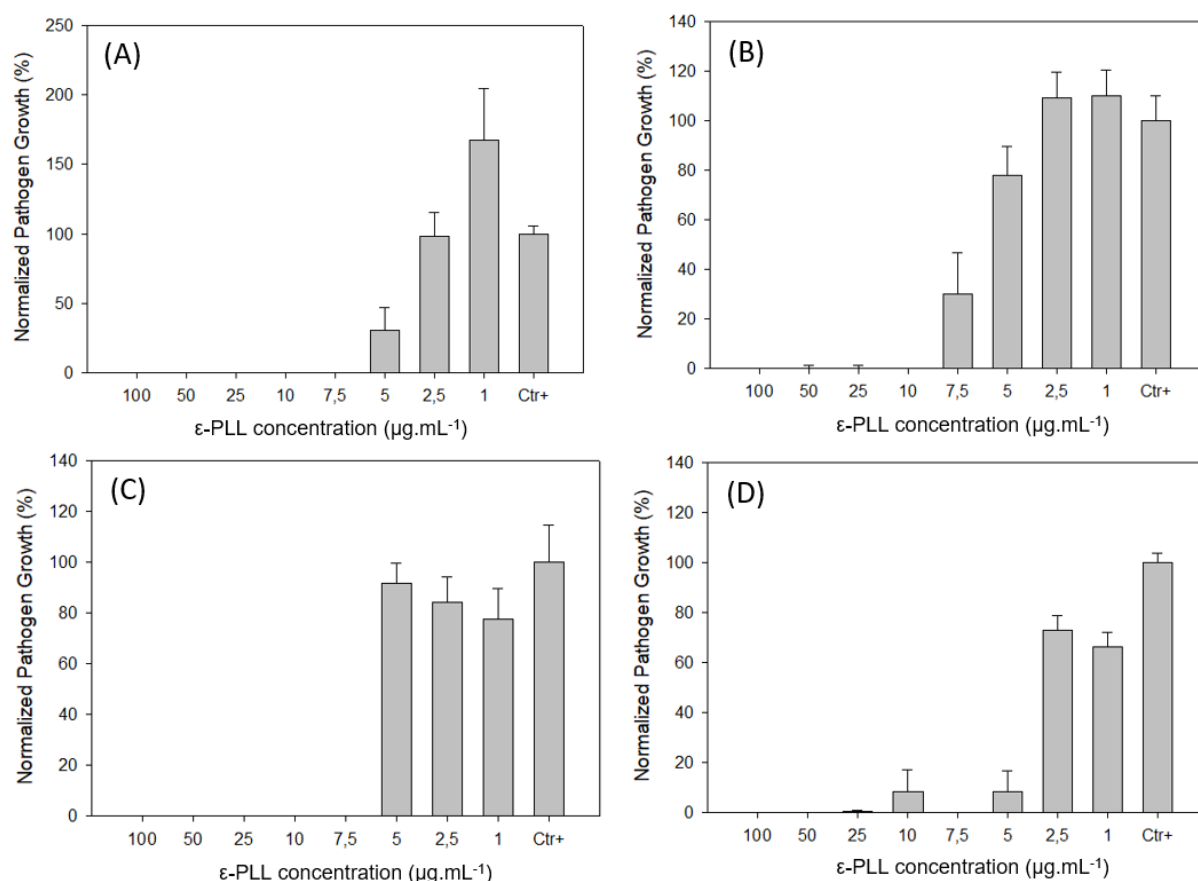


Figure 4.3. Minimal inhibitory concentration (MICs) of ϵ -PLL in solution after 24 h in contact with *S. aureus* ATCC25923 (A), MRSA (B), *E. coli* ATCC25922 (C) and *P. aeruginosa* (D). All strains were added with a concentration of 8×10^5 CFU.mL⁻¹ at the beginning of the experiment. The graph represents averages normalized OD_{595nm} of three independent experiments and error bars represent standard error of the mean.

4.2.4.5. Antibacterial properties on Gram-positive and Gram-negative bacteria

The antibacterial efficacy of both hydrogels were evaluated against various bacterial strains. For these experiments, bacterial suspension was added to each well containing the hydrogels. The antibacterial activity was assessed by measuring the OD of the bacterial supernatant at 595nm after 24 h in contact with the hydrogels. After 24 h, both hydrogels inhibit completely *S. aureus* (99 % of inhibition for both hydrogels), MRSA (99 % of inhibition for both hydrogels), and *P. aeruginosa* bacterial growth (99 % of inhibition for ϵ -PLL/PEGDA-3.6 hydrogel and 98 % for ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogel) (**Figure 4.4.**). For *E. coli*, although the growth of the bacteria was not fully inhibited after 24 h of contact with both hydrogels, a significant difference was observed with ϵ -PLL/PEGDA-3.6 hydrogel, resulting in a 66 % decrease in bacterial growth. Conversely, no significant decrease was observed with the hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-0.7. Thus,

it appears that ϵ -PLL/PEGDA-3.6 hydrogel possesses stronger antibacterial activity on both Gram positive and Gram negative bacteria compared to the ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogel.

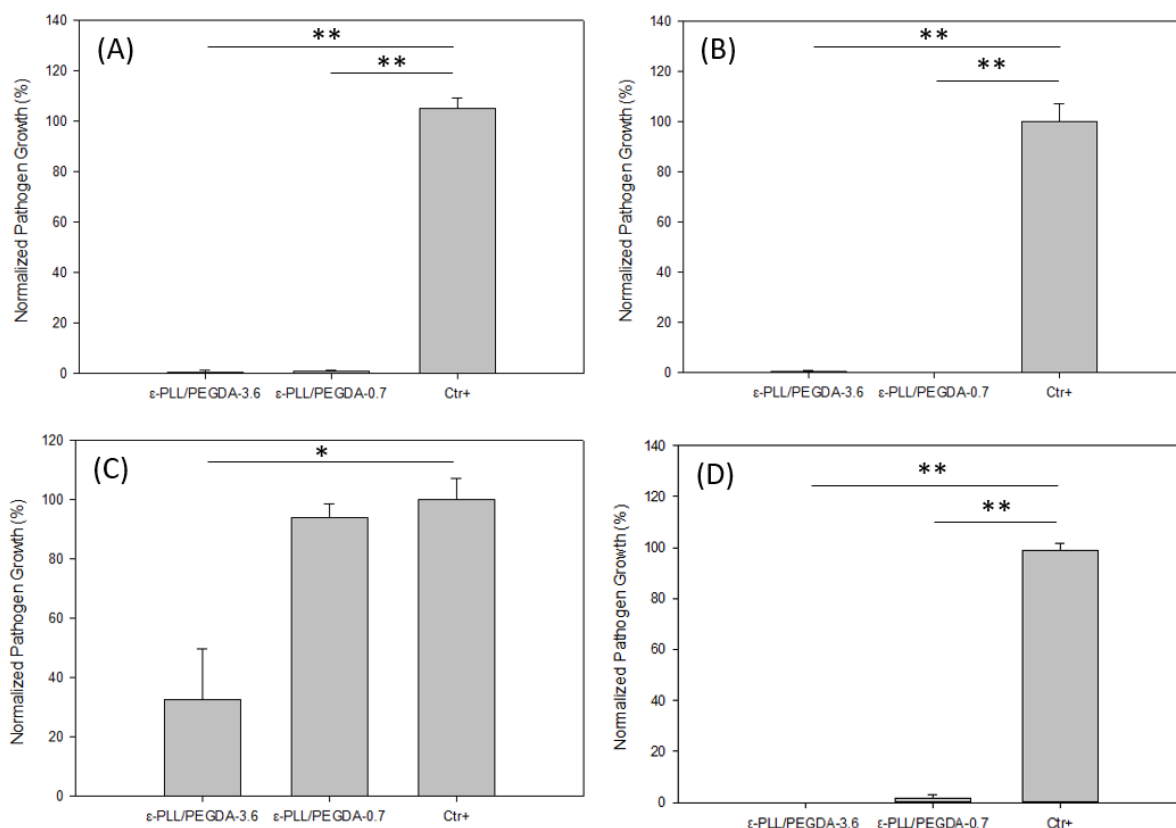


Figure 4.4. Antimicrobial activity of ϵ -PLL/PEGDA-3.6 and ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogels on *S. aureus* ATCC25923 (A), MRSA (B), *E. coli* ATCC25922 (C) and *P. aeruginosa* (D). The hydrogels were placed directly in contact of the bacteria suspension for 24 h at 37 °C under stirring. The optical density was measured at 595 nm and then normalized with the control (Ctr+) in which bacteria were cultured for 24 h without any hydrogels. The graph represents averages normalized OD_{595nm} of three independent experiments and error bars represent standard error of the mean. **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

Besides, the antibacterial properties of both hydrogels gelled in compresses were studied on *S. aureus*. The results are presented in **Figure S4.1**. For this experiment, hydrogels were poured inside compresses before the gellation process as explained previously and the antibacterial experiment was done in the same manner than before. A significant decrease of the *S. aureus* growth is observed for the two hydrogels with a decrease of 90 % with the hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-3.6 and of 94 % with the hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-0.7. Those decreases are a slightly smaller than with the hydrogels alone (not poured in compresses) due to the fact that the degradation of the hydrogels is faster without the compresses than when poured inside them. However, the hydrogels present still strong antibacterial properties even when poured in compresses.

Fluorescent dyes Syto®24 and CTC were to label bacteria that adhered to the surface of the hydrogels. Confocal images demonstrate that the number of bacteria that adhered to the surface of both ϵ -PLL/PEGDA-3.6 and ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogels is significantly lower than the number of bacteria on a glass surface (**Figure 4.5.**). Moreover, ϵ -PLL/PEGDA-3.6 shows stronger antifouling properties compared to ϵ -PLL/PEGDA-0.7. This was probably due to the differences in the elastic modulus of the hydrogels. Indeed, some studies proved the link between the mechanical properties of hydrogels, and more precisely the stiffness of the surface, and their antifouling properties^{40, 41}. The amount of adhered microorganisms increases with the decrease of the stiffness of the material, which is the case for our study. The other hypothesis is that ϵ -PLL/PEGDA-3.6 present stronger antibacterial properties compared to ϵ -PLL/PEGDA-0.7 and so less bacteria can adhere to the surface of this first hydrogel.

Thus, both hydrogels demonstrated robust antifouling properties, indicating that a part of their antimicrobial activity can be attributed to contact-killing, as it inhibits the adhesion of bacteria and subsequently biofilm formation on the surface. However, we wondered if the antibacterial activity is solely dependent on contact-killing mechanism or does it involve the release of ϵ -PLL into the surrounding medium through material degradation.

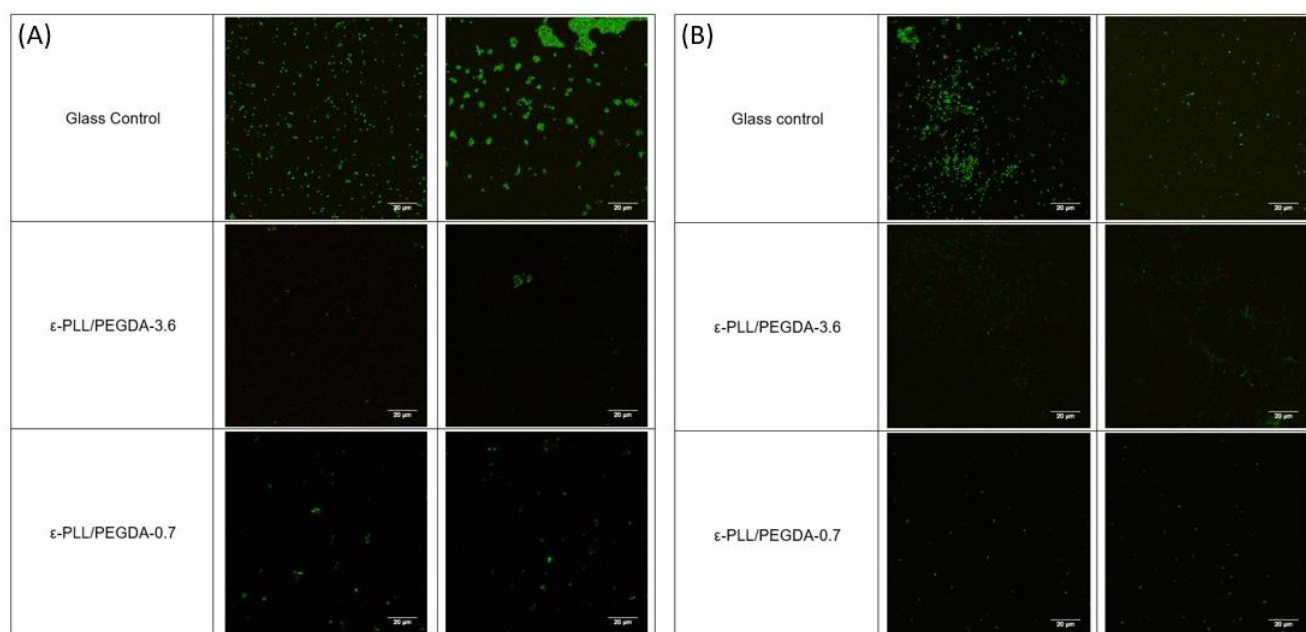


Figure 4.5. *S. aureus* (A) and *P. aeruginosa* (B) staining on the surface of both ϵ -PLL/PEGDA-3.6 and ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogels. The bacteria were stained with CTC and Syto®24 fluorescent dyes after being incubated with hydrogels for 24 h. The results on hydrogels were compared with a glass surface incubated for 24 h with bacteria as a control.

4.2.4.6. Antibacterial activity of the degradation products of hydrogels

To investigate the potential antimicrobial activity resulting from the release of antimicrobials, hydrogels were placed into MHB for 24 h under agitation. The extracted hydrogel medium was then tested for its antimicrobial properties against *S. aureus* and *P. aeruginosa*. The results obtained for this experiment are similar to the first results observed for the hydrogel directly in contact to the medium (**Figure 4.6.**). Indeed, both extracted hydrogel medium present strong antibacterial properties on both *S. aureus* and *P. aeruginosa*. However, the inhibition of *S. aureus* growth is lower than for the direct experiment with the extracted ϵ -PLL/PEGDA-3.6 hydrogel medium, but this difference is not significant (93 % of inhibition instead of 99 % previously). On *P. aeruginosa*, both hydrogels present lower antibacterial activity than in the direct test as the inhibition is about 92 % with both extracted ϵ -PLL/PEGDA-3.6 and ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogel media (instead of 99 % in direct test). Based on our findings, we can draw the conclusion that the antibacterial activity of both hydrogel is attributed to two mechanisms. Firstly, the release of antibacterial molecules into supernatant effectively inhibits and eliminates a significant portion of the bacteria. Secondly, the contact-killing properties prevents the sedimentation of bacteria onto the surface of the hydrogels. It is noteworthy that the ϵ -PLL/PEGDA-3.6 hydrogel exhibits a remarkable slow degradation rate, yet it still possesses sufficient antimicrobial properties.

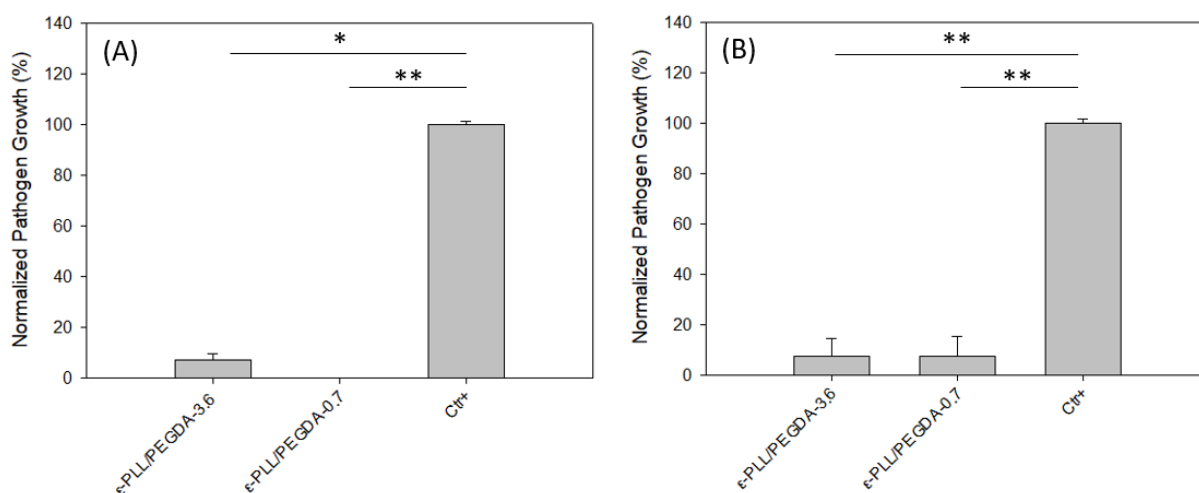


Figure 4.6. Antibacterial activity of extracted hydrogel media. The hydrogels were extracted in bacterial medium for 24 h and then the supernatant was added to *S. aureus* bacterial suspension (A) and *P. aeruginosa* bacterial suspension (B) for 24 h. The graph represents averages normalized OD_{595nm} of three independent experiments and error bars represent standard error of the mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.2.4.7. Determination of the cytotoxic concentration of ϵ -PLL

The cytotoxicity of the ϵ -PLL chains in solutions was also tested on BALB/3T3 fibroblasts. The polymer was added to cell culture medium at various concentrations and incubated with cells for 24 h. The cytotoxicity was determined by a MTT test after these 24 h. This MTT method enables to characterize the metabolic activity of mitochondria of fibroblastic cells. No cytotoxicity was observed for ϵ -PLL at concentrations up to 1mg.mL^{-1} (**Figure 4.7.**). Thus, the cytotoxic concentration is 100 times higher than the MIC which means that ϵ -PLL can be used for the development of biomaterials in a large range of concentrations. This result is promising for the use of our hydrogels for biomedical applications.

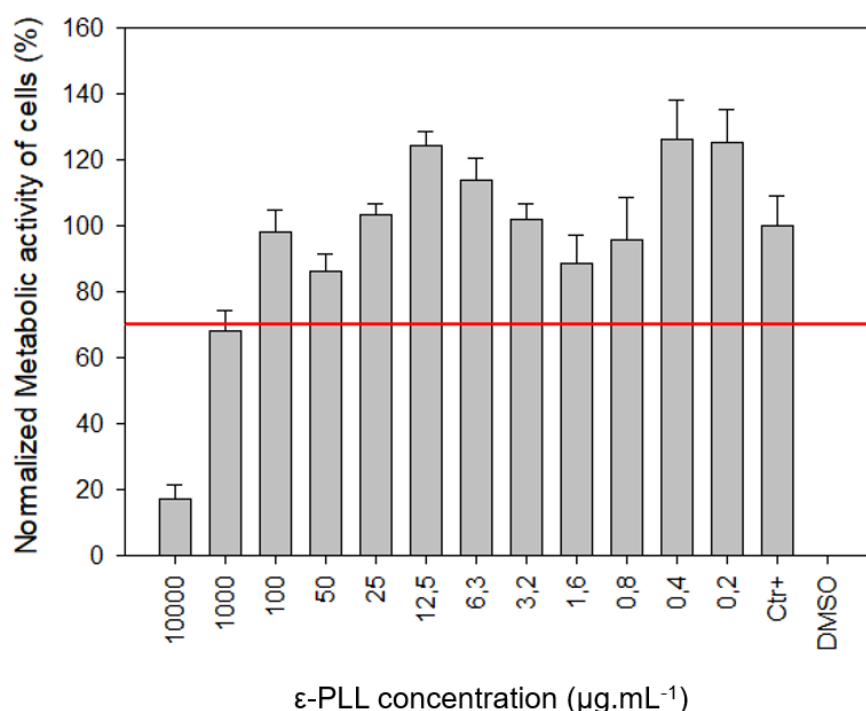


Figure 4.7. Metabolic activity of BALB/3T3 cells after 24 h in contact with ϵ -PLL in solution at different concentrations. The metabolic activities were quantified by a MTT test. The absorbance obtained for each concentration was normalized with a control (Ctr+) in which the cells were cultured for 24h in cell culture medium only. The graph represents averages of three independent experiments and error bars represent standard error of the mean.

4.2.4.8. Biocompatibility

Biocompatibility is necessary to check for the application of hydrogels in biomedical field. A test for quantifying the cytotoxicity of the materials was done on fibroblastic cells using MTT method. According to ISO 10993-5 standard, a metabolic activity higher than 70 % indicates that the material is not cytotoxic.

First, the cytotoxicity of hydrogels in direct contact with cells was studied. (**Figure 4.8.A**). The metabolic activity of cells was quantified after being in contact with hydrogels for 24 h. The results present that the ϵ -PLL/PEGDA-3.6 hydrogel is not cytotoxic as the metabolic activity is higher than 70 % (about 73 %). Moreover, the second hydrogel with a ratio amine / acrylate of 0.7 presented a slight cytotoxicity with a metabolic activity of 60 %. This cytotoxicity is mostly due to the method used for the test. Indeed, during this experiment, the hydrogels were added directly onto the cells. The cells below the material can't grow as they do not have enough medium to live. Besides, the concentration of degraded hydrogel in this area is higher than in the entire medium which increase the toxicity locally.

Then, cytotoxicity of extracted materials was studied. The hydrogels were extracted in cell culture medium for 24 h. After 24 h, both hydrogels were completely degraded in the medium. Then, the extracted hydrogel medium was added in contact to the cells at different concentrations and the metabolic activity of cells in contact with the extracted hydrogel supernatant was quantified using a MTT method after 24 h. As presented in **Figure 4.8.B**, the metabolic activity of BALB/3T3 cells that were incubated in 100 % of extracted ϵ -PLL/PEGDA-3.6 hydrogel medium for 24 h is about 95 %. Thus, this result confirms the first result obtained for the direct cytotoxic test. Concerning the ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogel, no cytotoxicity is observed for 12.5, 25 and 50 % of extracted medium, with 78 % of cell metabolic activity at 50 % of extracted hydrogel medium. At 100 % of extracted hydrogel medium, the metabolic activity of the cells is about 65 %. This slight cytotoxicity is probably due to the presence of remaining acrylate functions that did not react with the amine functions and that were not reduced by the TCEP during rinsing step. Moreover, the results for cytotoxicity of extracted materials can present higher toxicity than direct method as the concentration of extracted products is directly high compared to the concentration of the degraded material that increases slowly under time. Thus, ϵ -PLL/PEGDA-3.6 hydrogel shows a good biocompatibility on fibroblast cells with a metabolic activity higher than 70 % for all the test performed. The ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogel presents a slight cytotoxicity that was expected due to the high amount of acrylate functions compared to the other hydrogel.

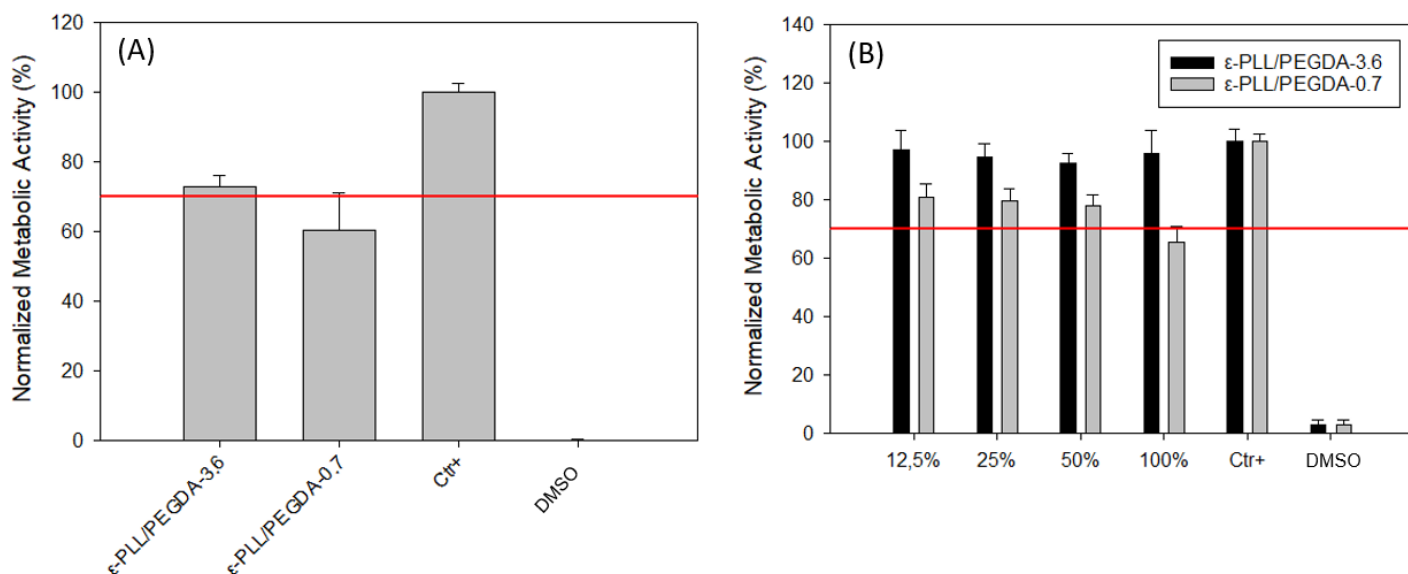


Figure 4.8. Metabolic activity of BALB3T3 cells after 24 h in direct contact with hydrogels (A) and 24 h in contact with extracted hydrogel medium (B). The metabolic activity of cells was quantified using a MTT test and the measured absorbance was normalized with a control (Ctr+) in which the cells were cultured for 24 h in cell culture medium only. The Ctr- sample represent a control where the cells were cultured for 24 h in cell culture medium with the addition of 10 % of DMSO. The graph represents averages of three independent experiments and error bars represent standard error of the mean.

4.2.4.9. Antifungal activity of hydrogels

First, we compared the MICs on *C. albicans* of two peptides: PAR10 and ε-PLL. The **Figure 4.9.** presents the results we obtained. The MIC of the ε-PLL on *C. albicans* is higher than $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ whereas the MIC of PAR10 on the same strain is only $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Thus, we decided to add PAR10 to the hydrogel before the gelation process to improve the antifungal properties of our hydrogels. Indeed, the first hydrogels we developed were composed only of PEGDA and ε-PLL. Only ε-PLL present antifungal activity but as presented just before, the concentration that need to be released from the hydrogels is too high so that the hydrogels provide an antifungal activity to the hydrogels.

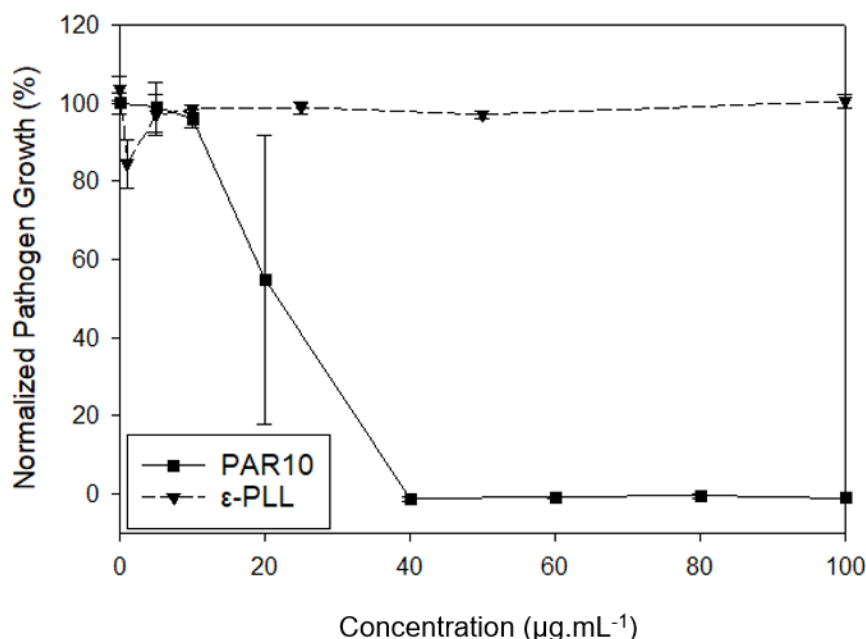


Figure 4.9. Minimal Inhibitory Concentrations of PAR10 and ϵ -PLL in solution after 24 h in contact with *C. albicans* fungi. The fungi were added at a concentration of 8×10^5 CFU.mL⁻¹ at the beginning of the experiment. The graph represents averages normalized OD_{595nm} of three independent experiments and error bars represent standard error of the mean.

The rheological properties of these new hydrogels were studied to see if there is some difference in their elastic modulus and their gelation point. For the hydrogels with or without PAR10, we observe the same elastic modulus of around 5 000 Pa for the hydrogels ϵ -PLL/PEGDA-3.6 and ϵ -PLL/PEGDA-3.6 + PAR10 and around 700 Pa for the hydrogels ϵ -PLL/PEGDA-0.7 and ϵ -PLL/PEGDA-0.7 + PAR10. The gelation point is also the same with or without the addition of PAR10. Thus, the addition of PAR10 to the reaction mixture has no impact on its rheological properties.

Then, *C. albicans* fungi were added on hydrogels that contain PAR10 or not for 24 h and then the OD_{595nm} of the supernatant was measured. The results are presented on **Figure 4.10**. For both hydrogels without the addition of PAR10, an important increase of the pathogen growth was noticed. This pathogen growth is higher than 100 % (132 % for ϵ -PLL/PEGDA-3.6 hydrogel and 111 % for ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogel) which means that hydrogels without PAR10 improve the fungi growth. However, with the addition of PAR10, the fungi growth is drastically inhibited, with an inhibition higher than 99 % with both hydrogels. Thus, the addition of PAR10 inside the hydrogel before the gelation process improves the antifungal properties of the materials on *C. albicans*.

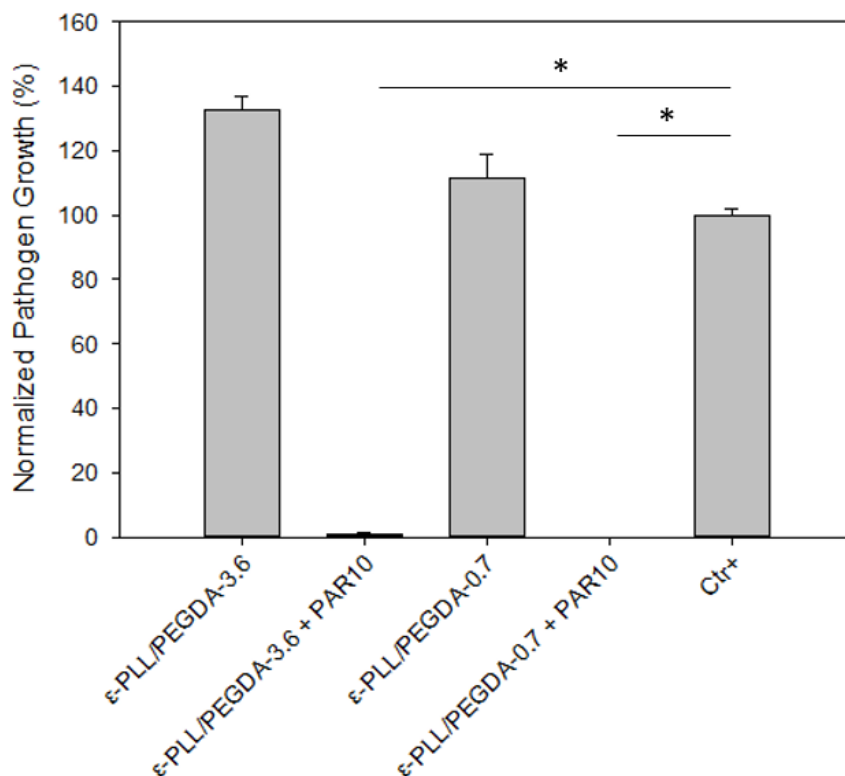


Figure 4.10. Antifungal activity of ϵ -PLL/PEGDA-3.6 and ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogels with and without the addition of PAR10 after 24 h in contact with *C. albicans*. The hydrogels were placed directly in contact of the fungal suspension for 24 h at 37 °C under stirring. The optical density was measured at 595 nm and then normalized with the control (Ctr+) in which fungi were cultured for 24 h without any hydrogels. The graph represents averages normalized OD_{595nm} of three independent experiments and error bars represent standard error of the mean. * $p < 0.05$.

Moreover, the antibacterial properties of these hydrogels were also tested on the four bacteria strains previously studied (**Figure 4.11.**). The results show that the addition of PAR10 to both hydrogels does not decrease their antibacterial activity on all tested strains. On the contrary, a larger decrease of the *E. coli* growth is observed when PAR10 was added than hydrogel prepared without the poly cation. Indeed, the ϵ -PLL/PEGDA-3.6 + PAR10 hydrogel presents a 100 % of inhibition of *E. coli* (vs. 70 % without PAR10) and the ϵ -PLL/PEGDA-0.7 + PAR10 hydrogel presents a decrease of more than 80 % (vs. 0 % without PAR10). Thus, the addition of PAR10 inside the hydrogels improves both their antifungal and their antibacterial properties.

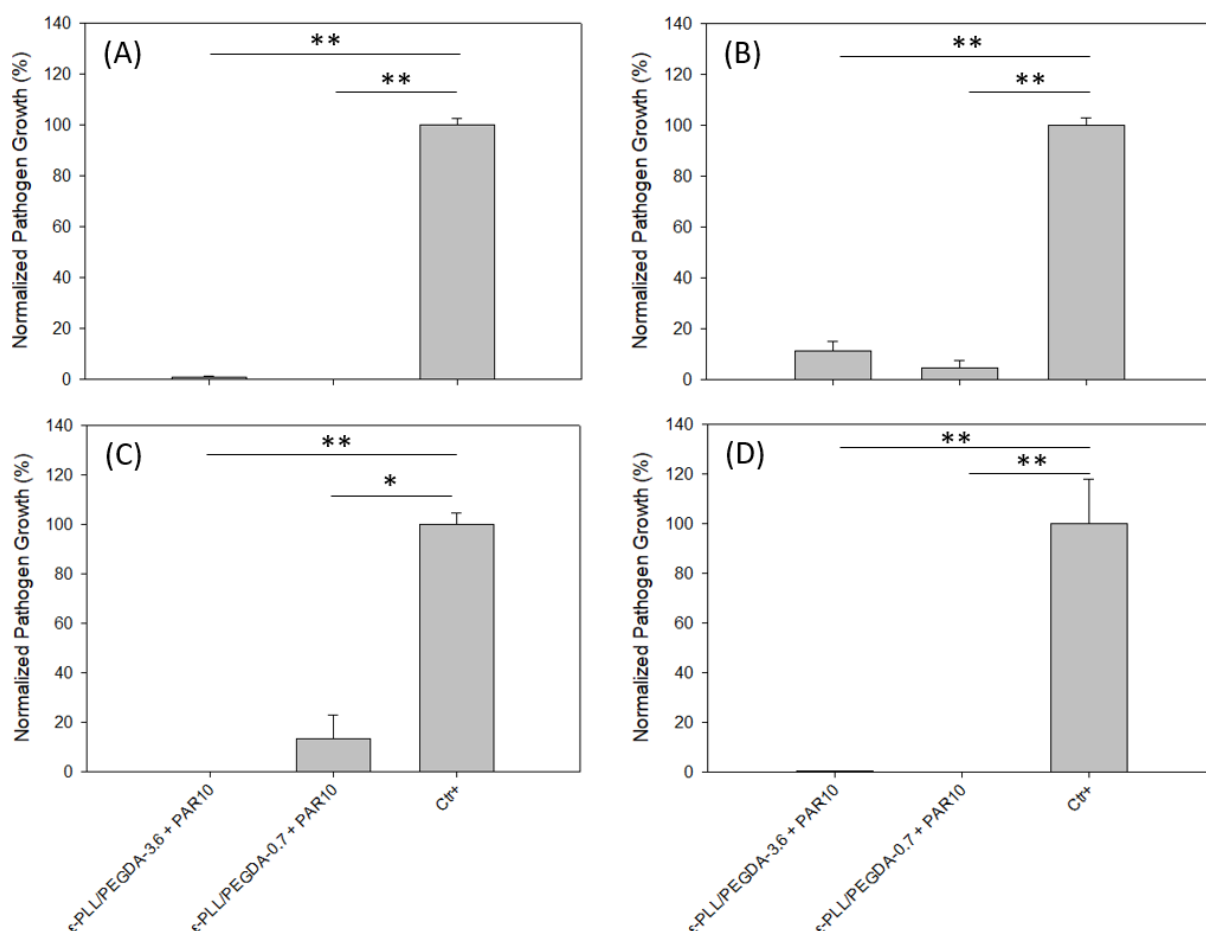


Figure 4.11. Antimicrobial activity of ϵ -PLL/PEGDA-3.6 + PAR10 and ϵ -PLL/PEGDA-0.7 + PAR10 hydrogels on *S. aureus* ATCC25923 (A), MRSA (B), *E. coli* ATCC25922 (C) and *P. aeruginosa* (D). The hydrogels were placed directly in contact of the bacteria suspension for 24 h at 37 °C under stirring. The optical density was measured at 595 nm and then normalized with the control (Ctr+) in which bacteria were cultured for 24 h without any hydrogels. The graph represents averages normalized OD_{595nm} of three independent experiments and error bars represent standard error of the mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

The cytotoxicity of these new hydrogels was also tested on BALB/3T3 fibroblasts. The cytotoxicity of the extracted hydrogels is presented in **Figure 4.12**. A small increase of the toxicity was observed for the ϵ -PLL/PEGDA-3.6 + PAR10 hydrogel with a metabolic activity around 64 % compared to the control without extracted hydrogels (the metabolic activity of the ϵ -PLL/PEGDA-3.6 hydrogel was 95 % without the PAR10). This result was expected as PAR10 presents a small cytotoxicity at this concentration in medium. Surprisingly, the cytotoxicity of the ϵ -PLL/PEGDA-0.7 + PAR10 hydrogel is smaller than the one of the same hydrogel without the addition of PAR10. This can be due to a small amount of PAR10 reacting with the remaining acrylate functions and so this decrease the number of free acrylate functions in the hydrogel.

Thus, these ϵ -PLL/PEGDA + PAR10 hydrogels are presenting strong antifungal and antibacterial properties. These properties were improved due to the addition of PAR10, and without having a great impact on the cytotoxicity on fibroblast cells.

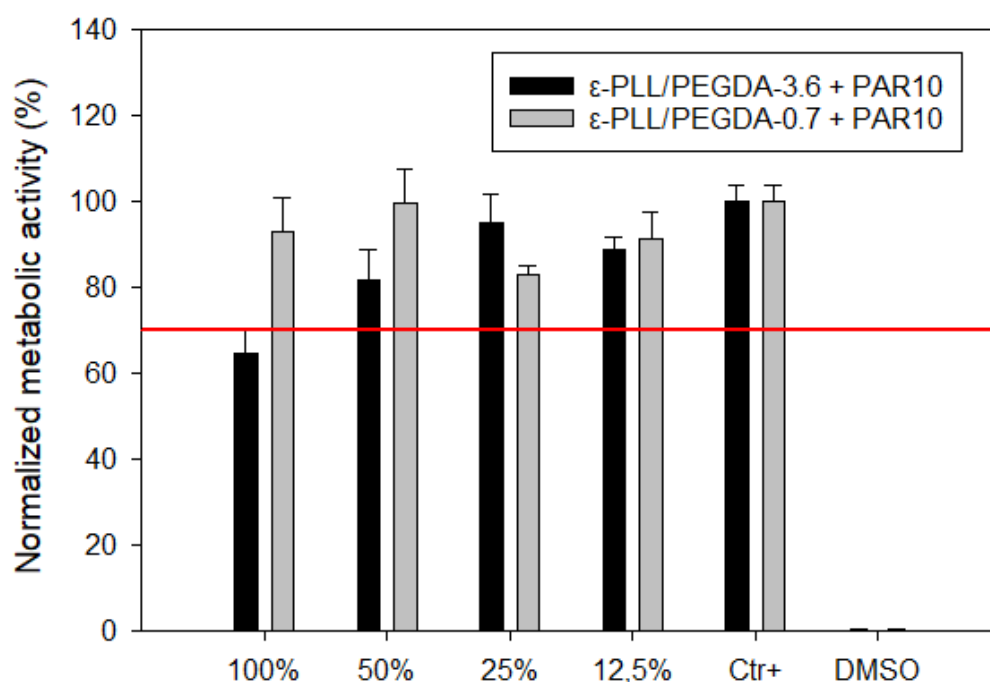


Figure 4.12. Metabolic activity of BALB3T3 cells after 24 h in contact with extracted hydrogel medium. The metabolic activity of cells was quantified using a MTT test and the measured absorbance was normalized with a control (Ctr+) in which the cells were cultured for 24 h in cell culture medium only. The Ctr- sample represent a control where the cells were cultured for 24 h in cell culture medium with the addition of 10 % of DMSO. The graph represents averages of three independent experiments and error bars represent standard error of the mean.

Finally, the pro- and anti-inflammatory properties of the supernatant in which hydrogels were extracted were studied by quantifying the NO secreted by LPS-stimulated macrophages by a Giess-Saville assay. The NO quantity was measured and normalized with the NO secreted by macrophages treated with LPS at 10 ng.mL^{-1} in cell culture medium. The results are shown in **Figure 4.13**. Initially, no significant difference was observed in the amount of NO secreted by macrophages when cells were treated with only supernatants of the 4 extracted hydrogels. Indeed, whatever the hydrogel, the amount of NO secreted is low (less than 10 % compared to that measured when the macrophages are treated with LPS, a molecule inducing polarization into M1 macrophages). This emphasizes that none of the hydrogels exhibit pro-inflammatory properties. Similarly, no difference is observed between the secretion of NO by the macrophages treated with IL-4 or with the supernatant of extracted hydrogel, and this regardless of the hydrogel. Then, to stimulate the polarization of macrophages into M1 pro-inflammatory phenotype, LPS was added to the supernatant of extracted hydrogels. For

ϵ -PLL/PEGDA-3.6 and ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogels, the NO secreted by macrophages is about 75 % and 93 %, respectively, of the NO quantity secreted by macrophages treated with only LPS. These two hydrogels enable a slight non-significant reduction of the inflammation. Besides, for hydrogels loaded with PAR, i.e. ϵ -PLL/PEGDA-3.6 + PAR10 and ϵ -PLL/PEGDA-0.7 + PAR10, this amount of NO is much lower (12 % and 28 %, respectively in comparison to LPS-stimulated macrophages), which means that the addition of PAR10 significantly reduces the pro-inflammatory activity by reducing the polarization of macrophages into M1 pro-inflammatory macrophages. These results are in agreement with earlier studies as the anti-inflammatory activity of PAR on macrophages was already presented by Gribova *et al.*³⁷.

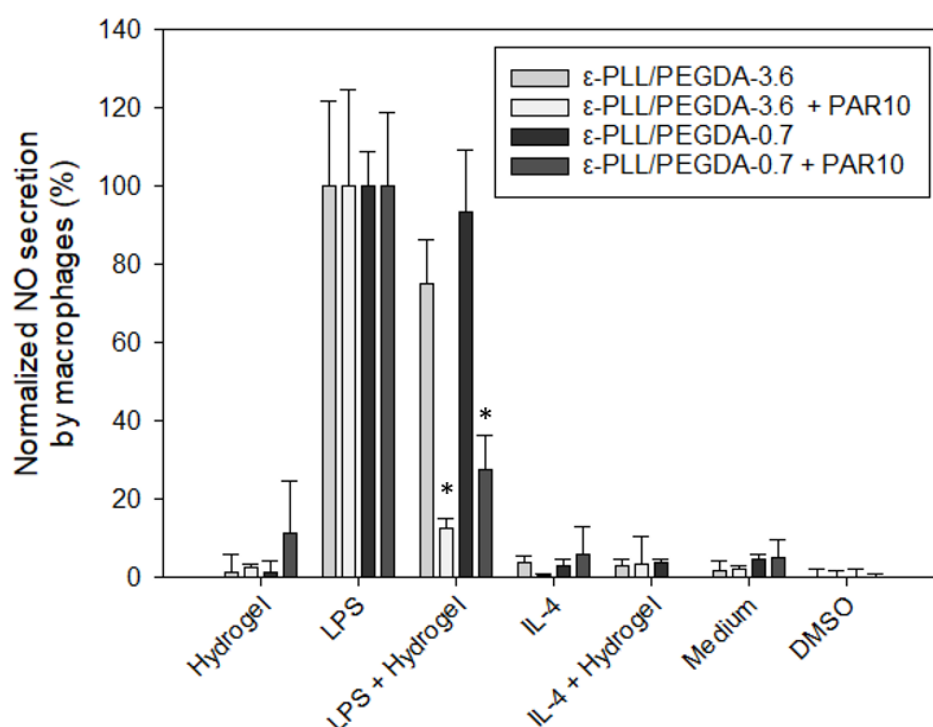


Figure 4.13. Rate of NO released by RAW264.7 macrophages after 24 h of treatment with different hydrogel extracts. A control (100%) with only LPS was prepared in order to induce the polarization of macrophages into M1 phenotype. Similarly, a control with IL-4 was prepared to induce polarization into M2 phenotype. Finally, the level of NO secreted by macrophages in the presence of LPS (or IL-4) with the addition of the extracted material was compared with the amount of NO secreted by macrophages in the presence of LPS or IL-4 alone. The experiment was done three times in an independent manner. The graph represents averages of three independent experiments and error bars represent standard error of the mean. * $p < 0.05$ regarding LPS control.

4.2.4.10. *In vivo* experiments

In vivo experiments were performed on mice by C.RIS Pharma (France) using an infected wound model. For this model, the back of each mice was wounded by stripping before infected with *MRSA*. The wounds were treated with the hydrogels that were previously poured inside compresses or with ointment Bactroban containing mupirocin. After 3 days of treatment, the mice were sacrificed for performing different quantifications: concentration of bacteria at skin, histopathological study, pro and anti-inflammatory cytokines and vascular epithelial growth factor (VEGF).

First, the number of colony forming unit per mg (CFU.mg⁻¹) on the wound after 3 days of treatment with the hydrogels was counted (**Figure 4.14.**). Wounds treated with ϵ -PLL/PEGDA-3.6 hydrogel presented a decrease of 40 % compared to the non-treated wounds (3 015 CFU.mg⁻¹ with the ϵ -PLL/PEGDA-3.6 hydrogel and 5 032 CFU.mg⁻¹ for the non-treated wounds, which is a decrease of about 0.2 log). The treatment with ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogel enables to decrease the infection from about 65 % (0.45 log) with only 1 786 CFU.mg⁻¹ on the skin compared to the non-treated wounds. The decrease is thus higher when ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogels were put on the infected site compared to ϵ -PLL/PEGDA-3.6 hydrogels. This result is probably due to the faster degradation of ϵ -PLL/PEGDA-0.7 compared to ϵ -PLL/PEGDA-3.6, and so to the higher release of antibacterial molecules. The wounds treated with antibiotics presented an absence of bacteria which is expecting as the wounds were treated three times with the ointment containing a large amount of antibiotics during the all experiment. Thus, the treatment with the hydrogels enables to decrease of the infection, but we were expecting a higher decrease of the number of bacteria on the infected site. This difference is probably due to the drying of the hydrogel during the experiment. Indeed, the antibacterial activity of the hydrogels is based on its degradation in a liquid medium. At the end of the experiment, the hydrogels poured inside compresses was completely dried, and so the hydrolysis, the reaction that enables the degradation of the biomaterial is not possible: the antibacterial component can't be enough released in the infected wound. With a better hydration, the degradation would be better and so the antibacterial activity would be increased.

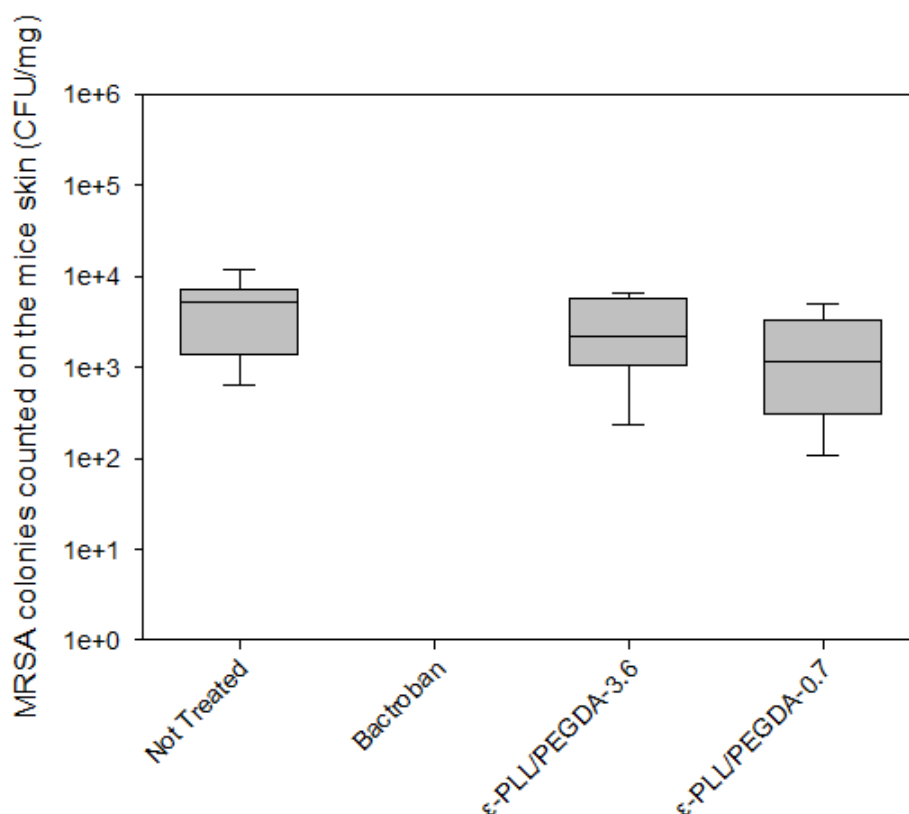


Figure 4.14. Number of CFU of MRSA per mg of skin of mice wounds after 3 days of treatment with both hydrogels or with bactroban applied on the wound 6, 24 and 30 h after the infection with MRSA. The number of colonies were compared with the number of colonies counted on the non-treated wounds. The graph presents the median value for the 7 wounds of each conditions, the 25th and 75th percentiles with error bar.

A histopathological study of the skin was also performed to determine the cumulated severity grades for the different samples. The microscopic findings were similar among both hydrogels, non-treated wounds and wounds treated with mupirocin 2 %. The most prominent features associated with the traumatic insult and the *S. aureus* infection were the epidermal ulceration with underlying dermal necrosis and neutrophilic inflammation. Furthermore, many hair follicles displayed degenerative changes compatible with the adhesive tape wounding (traction/traumatic alopecia). Reactive changes and lesions associated with the necrotizing and inflammatory process were also present.

Then, these features such as ulceration, vesicles formation, dermal necrosis or neutrophilic inflammation were graded following a grading system (from 1 that corresponds to a histopathologic change ranging from inconspicuous to barely noticeable but minor, to 5 that corresponds to a histopathologic change that is an overwhelming feature of the tissue. For multifocal or diffusely-distributed lesions, this grade was used for processes where greater than approximately 95% of the tissue in an average high-power field was involved). The total

of all of these grades was calculated and compared. The results are presented in **Table 4.3**. The treatment with ϵ -PLL/PEGDA-3.6 hydrogel presented the lowest cumulated severity grades with a group total score of 61 whereas the non-treated samples show a total score of 81. The biggest differences between group average scores per lesion were present in the dermal necrosis (highest for ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogel with a score of 13 and mupirocin treatment with a score of 11) and the ulceration (highest for the treatment with mupirocin with a score of 18 whereas with the treatment with ϵ -PLL/PEGDA-3.6, the score is only 1). Thus, treatment with ϵ -PLL/PEGDA-3.6 hydrogel tends to decrease the different features linked to an *S. aureus* infection.

Table 4.3. Group average scores per lesion and group total scores quantified by histological study for both ϵ -PLL/PEGDA-3.6 and ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogels, for not treated wounds and for wounds treated with bactroban containing 2 % of mupirocin. The table represent the severity grades that can occur on the skin tissues during an infection with MRSA.

	Not treated	Mupirocin	ϵ -PLL/PEGDA-3.6	ϵ -PLL/PEGDA-0.7
Inflammation, dermis/panniculus, neutrophilic	10.00	13.00	11.00	15.00
Necrosis, dermal	2.00	11.00	1.00	13.00
Ulceration	2.00	18.00	1.00	11.00
Ballooning degeneration, epidermis	6.00	1.00	1.00	3.00
Epidermal hyperplasia	14.00	14.00	15.00	13.00
Fibroplasia, dermoepidermal junction	8.00	4.00	6.00	8.00
Hydropic degeneration	8.00	3.00	5.00	5.00
Vesicle formation	4.00	1.00	1.00	3.00
Compact hyperkeratosis	9.00	4.00	9.00	8.00
Epidermal dyskeratosis	1.00	0.00	0.00	0.00
Inflammation, dermis/panniculus, mononuclear	10.00	8.00	5.00	8.00
Hemorrhage	1.00	1.00	3.00	1.00
Serocellular crust	6.00	9.00	3.00	0.00
Total	81.00	87.00	61.00	88.00

Besides, blood was collected in order to detect and quantify pro and anti-inflammatory cytokines. IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ and TNF- α were quantified by a Multiplex assay. Results are presented in **Figure 4.15**. First, no significant difference in the concentrations of IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , IL-17A and IFN- γ cytokines is observed between both ϵ -PLL/PEGDA-3.6 and ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogels and the non-treated wounds. With the mupirocin treatment the level of IL-6, TNF- α and IL-17 increase compared to the non-treated wounds. Thus, the treatment with the antibiotic increase the inflammatory response which is not the case of both hydrogels. This increase of inflammatory cytokine can indicate a small toxicity of the antibiotics on the macrophage cells ⁴².

VEGF was also quantified in blood and serum (**Figure S4.2.**). For the non-treated wound, the quantification of VEGF ranges from 99.0 to 144.8 pg.mL⁻¹. For the mupirocin treatment, the quantification of VEGF ranges from 92.3 to 115.1 pg.mL⁻¹. For the treatment with

ϵ -PLL/PEGDA-3.6 hydrogel, VEGF concentration ranges from 103.9 to 140.7 pg.mL^{-1} , and with ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogel, VEGF concentration is between 98.3 to 138.6 pg.mL^{-1} . No statistically significant differences were observed between the different groups. Thus, the treatment with our hydrogels has no impact on the VEGF production.

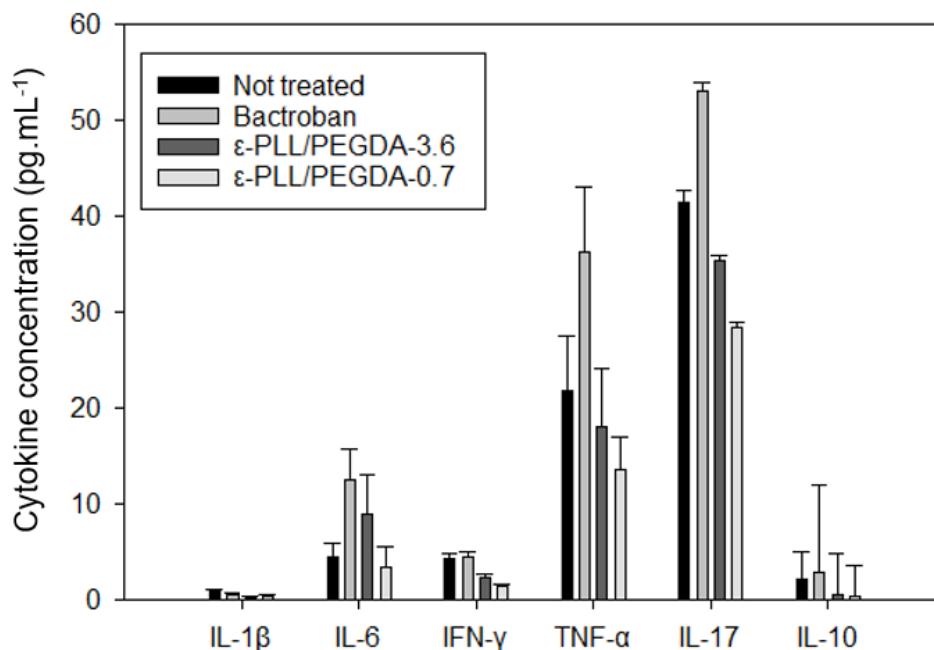


Figure 4.15. Cytokine quantification for *in vivo* experiment in mice. Different cytokines (IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17 and IL-10) were quantified after blood collection, using a multiplex cytokine assay. Each cytokine concentration is compared between the different treatment. The graph represents averages for the different animals of each condition and error bars represent standard error of the mean. No significant difference was observed between the different conditions.

4.2.5. Conclusion

Hydrogels are promising materials for applications in medical field, in particular for dressings and wound healing applications. In this study, new hydrogels composed of ϵ -PLL cross-linked with PEGDA are proposed. The rheological and mechanical properties of these materials can be easily tuned by varying both polymers concentrations and the ratio between reactive functions. Thus, elastic modulus can be chosen depending on the application. Moreover, ϵ -PLL presents strong antibacterial properties against both gram-positive and gram-negative bacteria and a very low toxicity on fibroblast cells. Thus, thanks to the presence of ϵ -PLL and due to their spontaneous degradation and to contact-killing, the developed hydrogels present strong antibacterial properties but also antifouling properties. They also present low toxicity in medium, which is due to acrylate functions. PEGDA/ ϵ -PLL hydrogels were also poured and absorbed in compresses for preventing infections on wounds. A decrease of the number of bacteria on a wound after treatment with the hydrogels can be observed. Finally, in addition to

their intrinsic properties, hydrogels may be loaded with active components to add new properties such as antifungal properties. By adding a poly cation that possess antifungal properties before the gelation process, it is possible to inhibit fungi in a medium. Thus, these hydrogels present strong intrinsic properties that can be completed with various properties by loading molecules of interest inside their 3D network and released them during the degradation of the hydrogel.

4.3. Résultats complémentaires

Les hydrogels présentés précédemment possèdent donc des propriétés antibactériennes vis-à-vis des bactéries à Gram positif mais aussi à Gram négatif tout en étant non cytotoxiques. De plus, il est possible de charger ces hydrogels avec de la PAR avant gélification afin d'améliorer leurs propriétés antifongiques. D'autres caractérisations ont été effectuées dans le cadre de cette étude et sont présentées ci-dessous.

4.3.1. Réduction des fonctions acrylates par le TCEP

Au départ, les premiers hydrogels développés ont été rincés uniquement avec le tampon Tris / NaCl afin de neutraliser le pH des hydrogels. En effet, ces derniers ont été synthétisés à pH basique afin de permettre la réaction entre les fonctions acrylates et les fonctions amines. Le rinçage au tampon Tris / NaCl permet donc de diminuer le pH jusqu'à ce que l'hydrogel soit proche du pH physiologique. La cytotoxicité du milieu d'extraction des hydrogels avec ce mode de rinçage a été étudiée sur les fibroblastes BALB/3T3. Pour cela, le même protocole que précédemment a été utilisé. Des hydrogels ϵ -PLL/PEGDA-3.6 et ϵ -PLL/PEGDA-0.7 fraîchement préparés d'une masse de 25 mg ont été rincés deux fois au tampon Tris / NaCl (500 μ L pendant une minute puis 1 h), puis ont été introduits dans 1 mL de milieu de culture DMEM contenant 4.5 g.L⁻¹ de glucose, 10 % de FBS et 1 % de PS, avant d'être incubés à 37°C pendant 24 h. En parallèle, 6 000 cellules BALB/3T3 dans 100 μ L de milieu ont étéensemencées dans des plaques 96 puits, puis incubées à 37°C pendant 24 h. Le surnageant des hydrogels ont ensuite été ajoutés à différentes concentrations allant de 12.5 à 100 % d'extraits, dilués dans du milieu de culture. Les cellules ont été une nouvelle fois incubées à 37°C pendant 24 h. Ensuite, du MTT à 0.2 mg.mL⁻¹ dans du milieu de culture est ajouté après 24 h de traitement des cellules. Après 24 h de contact, les puits ont été vidés et 100 μ L de DMSO ont été ajoutés. L'absorbance à 570 nm a été mesurée au spectrofluorimètre. Les résultats sont présentés sur la **Figure 4.16**. Les hydrogels ϵ -PLL/PEGDA-3.6 présentent une faible cytotoxicité sur les cellules BALB/3T3. En effet, lorsque les cellules sont incubées dans 100 % de milieu d'extraction des hydrogels, l'activité métabolique des cellules est de 66 % par

rapport aux cellules incubées dans du milieu de culture. Par contre, le traitement avec du milieu contenant 100 % d'hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-0.7 extrait provoque une diminution de l'activité métabolique de 100 %. L'activité métabolique n'est également que de 10 % lorsque le milieu contenant l'hydrogel extrait est dilué par 2, montrant la forte cytotoxicité de ces hydrogels sur les cellules.

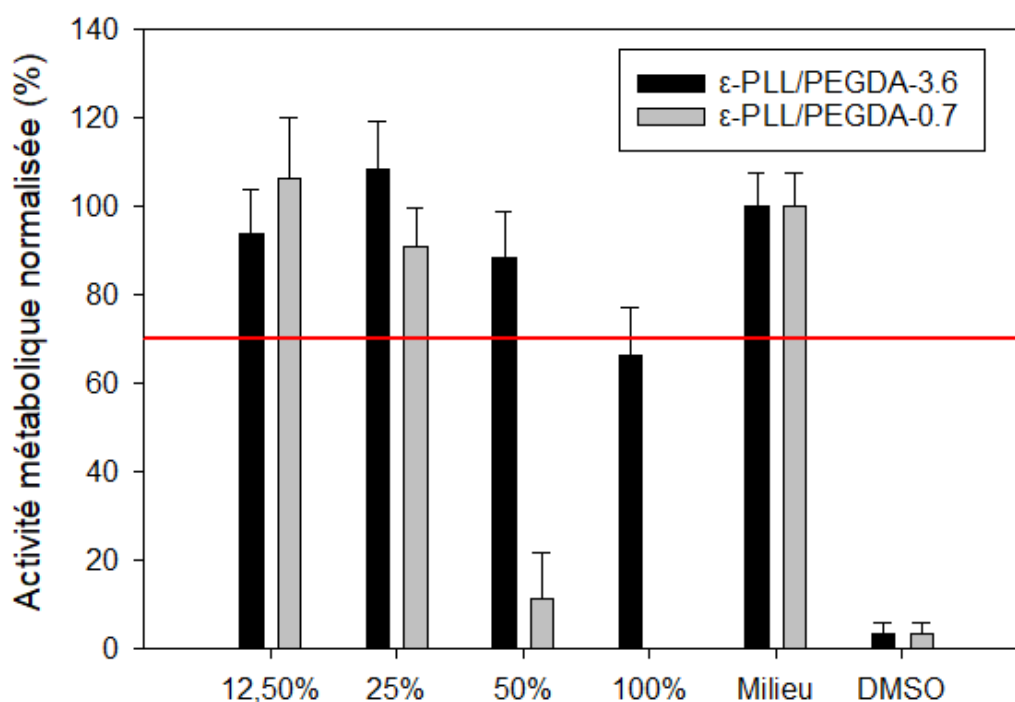


Figure 4.16. *Activité métabolique des cellules BALB/3T3 après 24 h de traitement avec le surnageant des hydrogels ϵ -PLL/PEGDA-3.6 et ϵ -PLL/PEGDA-0.7 extraits dans du milieu de culture. Cette expérience a été réalisée trois fois de manière indépendante. Les valeurs représentent les moyennes de ces trois expériences et les barres d'erreurs représentent l'erreur standard de la moyenne.*

La cytotoxicité des matériaux ne provient pas de la ϵ -PLL. En effet, cette dernière est biocompatible, même à de fortes concentrations comme montré sur la **Figure 4.7.** de la partie 4.2. Par contre, le PEGDA possède une forte cytotoxicité comme montré sur la **Figure S4.3.** Les hydrogels ϵ -PLL/PEGDA-0.7 présentent une cytotoxicité bien plus importante que les hydrogels ϵ -PLL/PEGDA-3.6. Ils contiennent également dans leur réseau 3D plus de 3 fois plus de PEGDA. La réduction de ces fonctions acrylates est donc nécessaire pour l'obtention de biomatériaux biocompatibles. Le TCEP, un réducteur bien connu a été utilisé. Comme montré sur **Figure 4.16.**, l'ajout de cette étape de rinçage avec le TCEP a bien permis de diminuer la cytotoxicité des hydrogels.

4.3.2. Mobilité des chaînes de ϵ -PLL dans le gel

La mobilité des chaînes de ϵ -PLL dans les hydrogels a été étudiée par recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (« fluorescence recovery after photobleaching », FRAP) afin de connaître le pourcentage de chaînes de ϵ -PLL libres, c'est-à-dire le pourcentage de chaînes de ϵ -PLL qui ne sont pas liées de manière covalente dans le réseau 3D des hydrogels ⁴³. Pour cela, la ϵ -PLL a été marquée avec une sonde fluorescente, l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) comme décrit par Mutschler *et al.*, puis cette ϵ -PLL-FITC a été utilisée dans la formation des hydrogels ⁴⁴. Ainsi, le PEGDA a été ajouté à un mélange ϵ -PLL / ϵ -PLL-FITC, puis les hydrogels ont été synthétisés de la même manière qu'expliqué dans la partie 2.5.3. du chapitre 2 de cette thèse. Une fois les hydrogels gélifiés et rincés, ils sont observés au microscope confocal à balayage laser équipé de filtres sélectionnant une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et une longueur d'onde d'émission de 520 nm. Une zone au centre de l'hydrogel est irradiée avec le laser argon à sa puissance maximale afin de détruire partiellement les sondes fluorescentes de cette zone (extinction de fluorescence ou photoblanchiment, « bleaching »). L'intensité de la fluorescence dans cette zone est ensuite mesurée pendant les 300 s suivant l'irradiation. Si la fluorescence apparaît à nouveau dans cette zone, cela indique que des molécules fluorescentes extérieures à la zone blanchie ont diffusé vers cette zone. En fonction de l'évolution de la fluorescence au cours du temps dans la zone blanchie, il est possible d'estimer la proportion de chaînes libres dans les hydrogels. En raison des difficultés à réaliser le marquage de la molécule de ϵ -PLL avec la FITC, cette expérience n'a pu être réalisée qu'une seule fois. Les résultats de cette étude sont présentés dans la **Figure 4.17**. Dans un premier temps, il est possible d'observer une différence d'intensité de la fluorescence à la fin de l'étape de photoblanchiment entre l'hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-3.6 et l'hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-0.7. En effet, pour le même temps d'irradiation, la fluorescence diminue plus fortement dans l'hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-0.7 que dans l'hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-3.6 avec une diminution de fluorescence de 54 % pour le premier alors qu'elle n'est que de 46 % pour le second hydrogel. Ce résultat peut être expliqué par le fait que la quantité de chaînes de ϵ -PLL-FITC est moins importante dans l'hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-0.7 que dans l'hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-3.6. En effet, la concentration en ϵ -PLL utilisée pour fabriquer l'hydrogel est beaucoup plus faible dans le premier cas et donc sa densité dans l'hydrogel est plus faible, ce qui peut expliquer ce résultat. Cette différence n'est cependant pas problématique pour la comparaison de la diffusion des chaînes de ϵ -PLL entre les deux hydrogels.

Ensuite, le pourcentage de chaînes immobiles dans les hydrogels a été calculé selon la formule donnée dans la partie 2.5.3. du chapitre 2 de cette thèse :

$$\% \text{ chaines immobiles} = 100 \times \frac{1 - I(e)/100}{1 - I(b)/100}$$

Avec $I_{(e)}$ l'intensité de la fluorescence à la fin de l'expérience et $I_{(b)}$ l'intensité de la fluorescence à la fin de l'exposition au laser à forte dose.

Pour l'hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-3.6, la proportion de molécules suffisamment mobiles pour permettre un recouvrement de la fluorescence est de 12 % (soit 88 % de chaines immobiles). Pour l'hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-0.7, cette proportion est de 23 % (soit 77 % de chaines immobiles). Ainsi, il semblerait que la proportion des chaines immobiles soit plus importante dans le cas de l'hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-3.6 que dans l'hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-0.7.

Ce résultat est en accord avec les propriétés mécaniques mesurées pour les deux hydrogels. En effet, l'hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-0.7 présente un module élastique 10 fois plus faible que l'hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-3.6 (comme présenté dans la **partie 4.2.** rédigée sous forme d'article). Ainsi, cette différence dans les propriétés mécaniques indique notamment que le réseau est beaucoup moins dense et réticulé dans le cas de l'hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-0.7 que l'hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-3.6. Ainsi, si le réseau est moins dense, les chaines ont la possibilité d'être plus mobiles dans l'hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-0.7, et ainsi permettre une libération plus rapide des molécules antibactériennes dans le milieu, conduisant à une lyse rapide des bactéries qui pourraient être présentes dans le milieu.

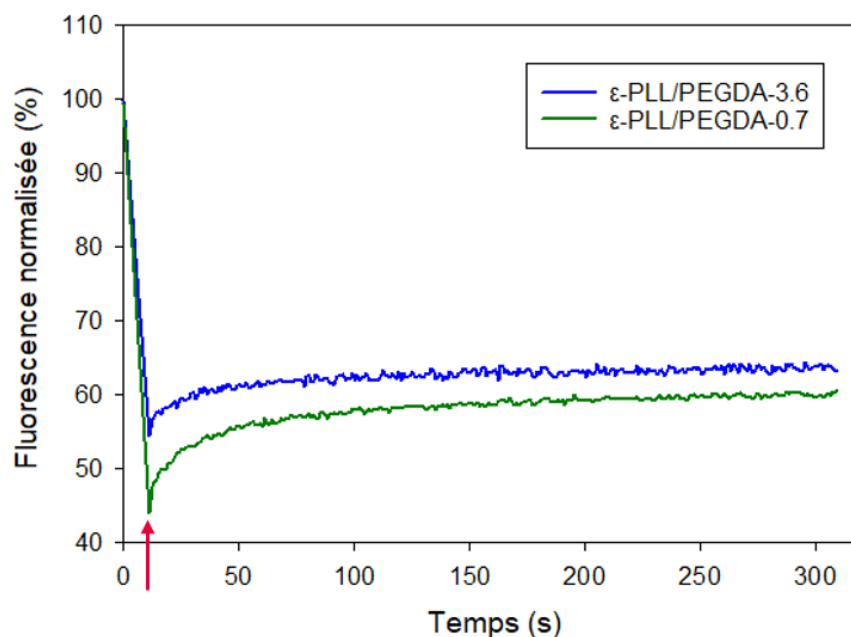


Figure 4.17. Evolution temporelle de l'intensité de la fluorescence dans une zone photoblanchie lors d'une expérience de FRAP. La courbe bleue correspond à la mobilité des chaînes de ϵ -PLL dans les hydrogels ϵ -PLL/PEGDA-3.6 et la courbe verte correspond à la mobilité des chaînes de ϵ -PLL dans les hydrogels ϵ -PLL/PEGDA-0.7. Dans un premier temps, la fluorescence de la zone d'étude a été partiellement éteinte par irradiation (fin du photoblanchiment indiqué par la flèche sur la figure).

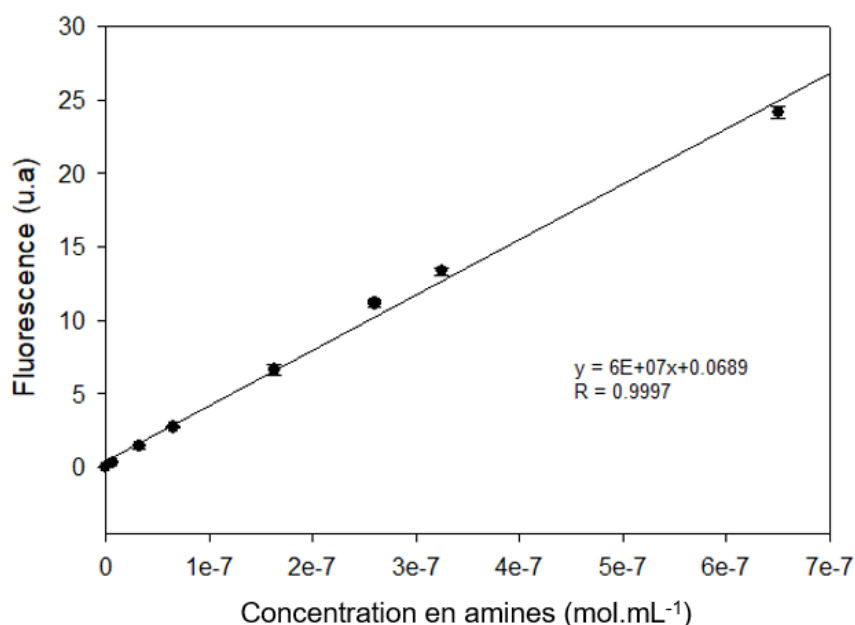
4.3.3. Dosage des amines primaires dans les hydrogels

Afin de connaître le nombre d'amines des chaînes de ϵ -PLL ayant réagi lors de la synthèse de l'hydrogel, un dosage des amines primaires a été effectué par fluorescence avec la fluorescamine. Ce composé non fluorescent peut réagir avec une amine primaire par substitution nucléophile formant un dérivé fluorescent ⁴⁵. En effet, en présence d'amines primaires, la fluorescamine peut se transformer en pyrrolone cationique fluorescent. Dans cette réaction, le pH du milieu doit être contrôlé afin d'éviter le changement de structure du cation en structure neutre non fluorescente (forme lactone ou 2-hydroxy-pyrrolinone) ⁴⁶.

Dans cette étude, les hydrogels ϵ -PLL/PEGDA-3.6 et ϵ -PLL/PEGDA-0.7 ont été dégradés juste après leur gélification en utilisant une solution de NaOH 0.15 M pendant 24 h à température ambiante. En effet, il avait été observé dans une étude préalable que les hydrogels étaient beaucoup moins stables dans un milieu basique que dans un milieu neutre ou acide. En parallèle, une gamme de concentrations de ϵ -PLL a été préparée dans du NaOH 0.15 M entre 1 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour établir une courbe étalon. De même, un tampon borate à 50 nM à pH 9 (pH permettant la formation du cation fluorescent entre la fluorescamine et les amines primaires) ainsi qu'une solution de fluorescamine à 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans du dioxane ont été préparés.

Dans des cuves en quartz, 40 μL de ϵ -PLL aux différentes concentrations sont introduits ainsi que 1.5 mL de tampon borate et 500 μL de fluorescamine. Une lecture de la fluorescence est effectuée à $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 480 \text{ nm}$. L'expérience a été effectuée en se plaçant à des concentrations en ϵ -PLL pour lesquelles la fluorescence du pyrrolone formé est linéairement proportionnelle à ces dernières afin d'obtenir une droite d'étalonnage. Cette droite d'étalonnage de la fluorescence du pyrrolone cationique formé entre la fluorescamine et les amines primaires en fonction de la concentration molaire d'amines est tracée (**Figure 4.18.**). Enfin, les échantillons d'hydrogels dégradés dans le NaOH sont étudiés de la même manière que pour la réalisation de la gamme étalon, c'est-à-dire que 40 μL de solution issue du surnageant des hydrogels dégradés sont introduits dans une cuve en quartz, ainsi que 1.5 mL de tampon borate et 500 μL de fluorescamine. En utilisant l'équation de la droite d'étalonnage, la concentration d'amines encore présentes dans l'hydrogel est calculée. La quantité de matière de ϵ -PLL introduite avant réaction avec le PEGDA étant connue, il est possible de calculer le pourcentage des amines ayant réagi lors de la synthèse des hydrogels.

Les résultats obtenus montrent une fluorescence plus importante pour l'hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-3.6 que pour l'hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-0.7, ce qui était attendu puisque la concentration en ϵ -PLL est trois fois plus grande dans le cas du premier hydrogel par rapport au second. De plus, d'après la fluorescence mesurée, 72 % des amines ont réagi lors de la synthèse de l'hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-3.6 et 97 % lors de la préparation de l'hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-0.7. Cela semble également cohérent puisque dans le cas de l'hydrogel possédant un ratio amines / acrylates égal à 3.6, les fonctions amines sont en excès alors que pour le second hydrogel elles sont probablement les fonctions limitantes dans la synthèse de l'hydrogel. Cependant, en utilisant ces données, la somme des fonctions acrylates libres et celles ayant réagi dans l'hydrogel est supérieure à la quantité d'acrylates introduite initialement. Cette technique de caractérisation a donc des limites et n'est pas assez précise dans notre cas d'études, en raison probablement de la polydispersité de nos polymères qui ne nous permet pas de calculer de manière suffisamment précise la quantité de matière introduite dans nos matériaux en acrylate et en amine et ainsi déterminer la quantité de fonctions ayant réagi. Cependant, ce dosage nous a permis de montrer que les fonctions amines primaires ont bien réagi lors de la synthèse des hydrogels et nous a donné une indication sur la densité de réticulation dans l'hydrogel.



	Absorbance mesurée	Qté matière amines départ (mol)	Qté matière amines dosées (mol)	% amines ayant réagis
ϵ -PLL/PEGDA-3.6	21,27	1,3188E-04	9,5376E-05	72 %
ϵ -PLL/PEGDA-0.7	5,63	6,3639E-05	6,16933E-05	97 %

Figure 4.18. Droite d'étalonnage de la fluorescence en fonction de la concentration d'amines dans la ϵ -PLL lors du dosage des amines primaires dans la ϵ -PLL. Tableau récapitulatif de la quantité de matière des amines présentes dans le milieu réactionnel avant réaction de la ϵ -PLL avec le PEGDA, la quantité de matière des amines primaires dosée par la fluorescamine et le pourcentage des amines ayant réagi avec le PEGDA lors de la synthèse des hydrogels.

4.3.4. Evaluation de la capacité de migration de cellules au sein d'une « blessure » en présence d'extraits d'hydrogels

Les hydrogels sont des matériaux très étudiés pour des applications de cicatrisation tissulaire. Ainsi, la vitesse de migration des cellules épithéliales MDCK au sein d'une « blessure » ou « gap » en présence des hydrogels extraits pendant 24 h dans du milieu de culture a été étudiée. Le « gap » a été produit grâce à l'utilisation de boîte de pétri contenant un insert en silicone. Après l'obtention d'une monocouche de cellules au fond des boîtes en présence de l'insert, ce dernier est retiré, permettant de former le « gap » dans lequel l'étude va se faire. Le protocole complet est schématisé sur la **Figure 4.19**.

Dans un premier temps, des hydrogels PEGDA / ϵ -PLL ont été préparés comme expliqué précédemment. Ils ont ensuite été pesés et découpés en morceaux de 50 mg, avant d'être rincés avec du tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) à 5 mg.mL⁻¹ dans du tampon Tris / NaCl afin de réduire les fonctions acrylates restantes et ainsi diminuer la cytotoxicité, puis avec du

tampon Tris / NaCl afin d'éliminer les résidus de TCEP. Enfin, chaque morceau de 50 mg a été extrait dans 2 mL de milieu de culture DMEM « low glucose » contenant 1 g.L⁻¹ de glucose, 10 % de FBS et 1 % de PS pendant 24 h à 37°C. De même, de la ϵ -PLL à 100 μ g.mL⁻¹ dans du milieu de culture DMEM « low glucose » a été incubée pendant 24 h à 37°C afin de voir l'effet de la ϵ -PLL seule en solution sur la vitesse de migration des cellules. Du milieu de culture DMEM « low glucose » seul a également été incubé pendant 24 h à 37°C comme contrôle afin de comparer la vitesse de fermeture du « gap » dans du milieu de culture seul et celle lorsque du milieu contenant l'hydrogel extrait est utilisé.

En parallèle de cela, des cellules épithéliales de rein de chien (MDCK) ont été cultivées dans du DMEM « low glucose ». Ces cellules sont connues comme modèle d'étude des processus de cicatrisation ⁴⁷. Elles ont étéensemencées dans des puits (μ -dish) de 35 mm de diamètre possédant un insert en silicone en leur centre (Ibidi, Allemagne). Les puits sont ensuite recouverts d'un couvercle puis incubés à 37°C pendant 24 h jusqu'à obtenir une monocouche de cellules recouvrant tout le fond du puits. Après ces 24 h, les inserts en silicone des μ -dish ont été retirés ainsi que le milieu de culture. Les cellules ont été rincées deux fois avec 1 mL de PBS afin d'éliminer les cellules qui auraient pu se détacher lors du retrait de l'insert, puis 2 mL du milieu de culture contenant l'hydrogel extrait ont été introduits. Un contrôle a également été préparé en ajoutant 2 mL de milieu de culture seul. De même, une dernière condition a été préparée en utilisant 2 mL de ϵ -PLL à 100 μ g.mL⁻¹ dans du milieu de culture DMEM « low glucose ». Enfin, 1.5 mL d'huile minérale a été ajouté sur chaque solution afin de limiter l'évaporation du milieu pendant l'expérience.

Un vidéomicroscope ("Timelapse") Nikon Ti-E (France) équipé d'une caméra Andor Zyla sCMOS (Andor Technology Ltd, Royaume-Uni) a été utilisé afin de suivre dans le temps la migration cellulaire au sein du gap. Un objectif x10 et le logiciel Nikon NIS-Elements Ar ont été utilisés. Lors de l'expérience, la température a été fixée à 37°C, le pourcentage de CO₂ à 5 % et l'humidité à 10 %. Une image a été prise toutes les 20 minutes pendant 40 h. Après ces 40 h, les logiciels Ilastik et Fiji ont été utilisés afin de quantifier l'évolution de l'aire du gap au cours du temps. Le logiciel Ilastik permet de différencier par traitement d'image les monocouches de cellules de la zone du gap sur toutes les images, puis le logiciel Fiji, en complément, permet de créer un masque noir / blanc de l'image (noir pour les cellules et blanc pour le gap), puis de compter le nombre de pixels correspondant au blanc et celui correspondant au noir. Il est ainsi possible de connaître le nombre de pixels que les cellules recouvrent et de suivre la diminution de l'aire du gap au cours du temps.

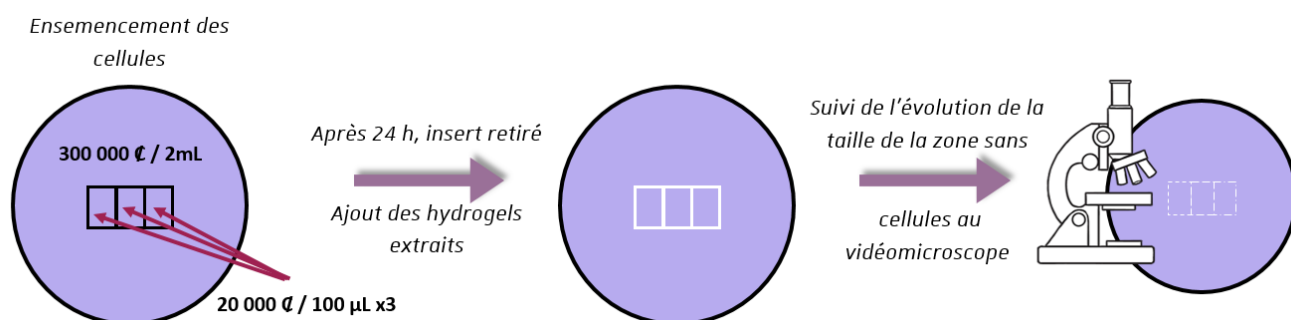


Figure 4.19. Protocole mis en place lors de l'étude de la vitesse de migration de cellules épithéliales au cours du temps. Dans un premier temps, les cellules sont ensemencées dans un puits contenant un fond en verre dans lequel un insert en silicone est placé. Une fois qu'une monocouche de cellules s'est formée au fond du puits, l'insert en silicone est retiré et le surnageant des hydrogels extraits ou bien le ϵ -PLL en solution sont ajoutés sur les cellules avec du milieu de culture. L'insert retiré a laissé place à une zone sans cellules, dénomé « gap ». L'évolution de l'aire du gap au cours du temps est suivie au vidéomicroscope (« timelapse ») pendant une période de 40 h.

La **Figure 4.20.** présente l'évolution temporelle de l'aire du gap normalisée par rapport à l'aire initiale du gap. Dans un premier temps, la diminution du gap quelle que soit la condition suit la même tendance. Cette dernière est tout d'abord lente lors des 250 premières minutes avec une diminution de l'aire du gap d'environ 10 %. Ensuite, la vitesse de migration des cellules accélère et devient constante pendant 15 h, puis cette dernière ralentit vers la fin de l'expérience. Cependant, la vitesse n'est pas la même en fonction des conditions. En effet, lorsque de la ϵ -PLL est ajoutée dans le milieu, la vitesse de fermeture du gap est beaucoup plus grande que celle obtenue lors du contrôle et avec le surnageant des hydrogels extraits. Une fermeture du gap de 80 % est obtenue après moins de 16 h, alors qu'il faut attendre 25 h pour le contrôle dans du milieu seul, 33 h pour l'hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-0.7 et ne sera pas atteint même après plus de 40 h avec l'hydrogel extrait ϵ -PLL/PEGDA-3.6. Ainsi, il semblerait que la ϵ -PLL permette d'augmenter la vitesse de migration des cellules dans un gap, et donc potentiellement la cicatrisation tissulaire. Cependant, les résultats présentés dans cette partie n'ont pas pu être reproduits lors des deuxièmes et troisièmes expériences effectuées dans les mêmes conditions que précédemment. En effet, lorsque l'expérience a été reproduite, aucune différence significative n'a pu être observée entre la vitesse de fermeture du « gap » lorsque les cellules ont été incubées dans du milieu seul et celle lorsque de la ϵ -PLL a été ajoutée dans le milieu de culture. Il est donc nécessaire de rester critique sur ces résultats et aucune conclusion fiable ne peut être donnée quant à l'influence de la ϵ -PLL sur la migration cellulaire. Dans de prochaines expériences, il serait intéressant de tester différentes concentrations de ϵ -PLL dans le milieu, en restant sous les concentrations cytotoxiques.

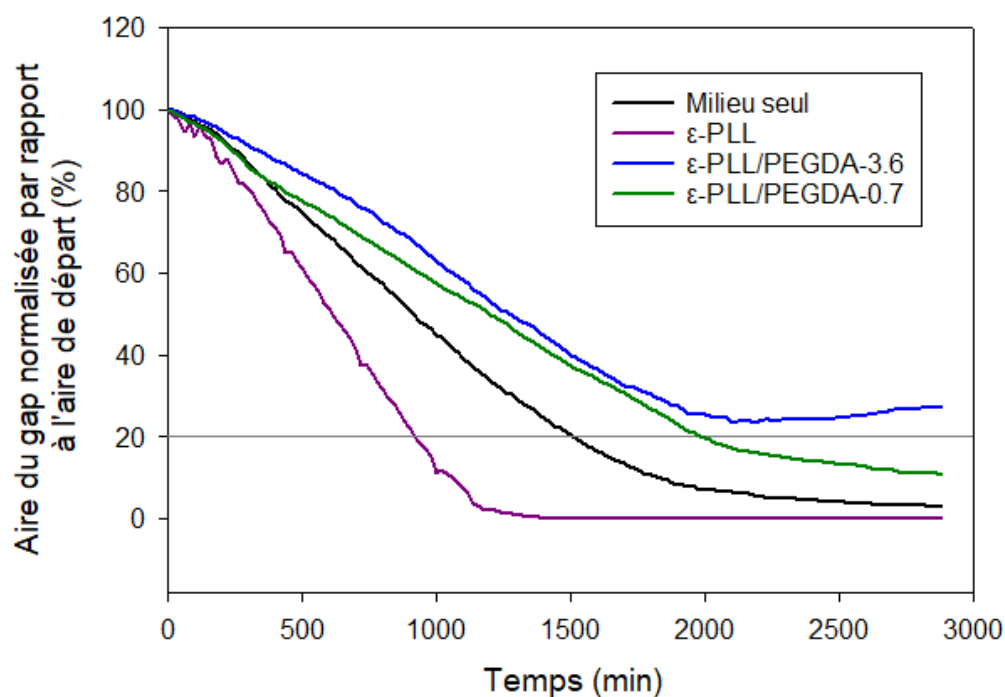


Figure 4.20. Migration des cellules MDCK dans un gap au cours du temps en présence ou non de ϵ -PLL ou d'hydrogels ϵ -PLL/PEGDA-3.6 et ϵ -PLL/PEGDA-0.7 extraits dans du milieu de culture. L'aire du gap a été mesurée grâce aux logiciels ImageJ et Ilastik. La courbe noire présente l'évolution de l'aire du gap lorsque les cellules sont placées dans du milieu de culture seul, la courbe violette lorsque les cellules sont placées dans de la ϵ -PLL à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dans du milieu de culture, la courbe bleue correspond aux cellules placées dans du milieu contenant l'hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-3.6 extrait et la courbe verte dans du milieu contenant l'hydrogel ϵ -PLL/PEGDA-0.7 extrait.

Références

1. X. Zhang, D. Yang and J. Nie, *Int J Biol Macromol*, 2008, **43**, 456-462.
2. J. Wang and H. Yang, *Sci Rep*, 2018, **8**, 7155.
3. W. Cao and C. Gao, *Polymer*, 2020, **186**, 122082.
4. M. Wyrwal, P. Koczurkiewicz, K. Wojcik, M. Michalik, B. Kozik, M. Zylewski, M. Nowakowska and M. Kepczynski, *J Biomed Mater Res A*, 2014, **102**, 721-731.
5. D. Liu and C. W. Bielawski, *Macromol Rapid Commun*, 2016, **37**, 1587-1592.
6. H. Knopf-Marques, J. Barthes, S. Lachaal, A. Mutschler, C. Muller, F. Dufour, M. Rabineau, E.-J. Courtial, J. Bystronova and C. Marquette, *Mater. Sci. and Eng.: C*, 2019, **104**, 109898.
7. A. Mutschler, L. Tallet, M. Rabineau, C. Dollinger, M.-H. Metz-Boutigue, F. Schneider, B. Senger, N. E. Vrana, P. Schaaf and P. Laval, *Chemistry of Materials*, 2016, **28**, 8700-8709.
8. S. Li, Y. Mao, L. Zhang, M. Wang, J. Meng, X. Liu, Y. Bai and Y. Guo, *Biotechnol Biofuels Bioprod*, 2022, **15**, 65.
9. S. Shima and H. Sakai, *Agric. Biol. Chem.*, 1977, **41**, 1807-1809.
10. C.D.C. Prevention, HAI and Antibiotic Use Prevalence Survey, <https://www.cdc.gov/hai/eip/antibiotic-use.html>, accessed : June 2022.
11. E.C.D. Control, Healthcare-associated infections: surgical site infections - Annual Epidemiological Report for 2016, <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/healthcare-associated-infections-surgical-site-infections-annual-0>, accessed : April 2021).
12. C. J. Crnich and P. Drinka, *Infect. Dis. Clin. N. Am.*, 2012, **26**, 143-144.
13. E. M. Kojic and R. O. Darouiche, *Clin Microbiol Rev*, 2004, **17**, 255-267.
14. Z. K. Zander and M. L. Becker, *ACS Macro Lett*, 2018, **7**, 16-25.
15. Y. Zheng, L. He, T. K. Asiamah and M. Otto, *Environ Microbiol*, 2018, **20**, 3141-3153.
16. K. Bakker, Z. Abbas and S. Pendsey, *Pract. Diab. Int.*, 2006, **23**, 365-369.
17. H. Nosrati, M. Khodaei, Z. Alizadeh and M. Banitalebi-Dehkordi, *Int J Biol Macromol*, 2021, **192**, 298-322.
18. S. Davis, L. Martinez and R. Kirsner, *Current Diabetes Reports*, 2006, **6**, 439-445.
19. S. Y. Kim, T. H. Kim, J. Y. Choi, Y. J. Kwon, D. H. Choi, K. C. Kim, M. J. Kim, H. K. Hwang and K. B. Lee, *Vasc Specialist Int*, 2018, **34**, 109-116.
20. S. Khatri, Y. Su and D. Zhu, in *Racing for the Surface*, eds. B. Li, T. F. Moriarty, T. Webster and M. Xing, Elsevier, 2020, pp. 341-356.

21. T. Verma, A. Aggarwal, S. Singh, S. Sharma and S. J. Sarma, *Journal of Molecular Structure*, 2022, **1248**, 131380.
22. A. Jayakumar, V. K. Jose and J. M. Lee, *Small Methods*, 2020, **4**, 1900735.
23. S. M. Gutowski, J. T. Shoemaker, K. L. Templeman, Y. Wei, R. A. Latour, Jr., R. V. Bellamkonda, M. C. LaPlaca and A. J. Garcia, *Biomaterials*, 2015, **44**, 55-70.
24. C. T. Johnson, J. A. Wroe, R. Agarwal, K. E. Martin, R. E. Guldborg, R. M. Donlon, L. F. Westblade and A. J. Garcia, *PNAS*, 2018, **115**, E4960-E4969.
25. Q. Xu, X. Li, Y. Jin, L. Sun, X. Ding, L. Liang, L. Wang, K. Nan, J. Ji, H. Chen and B. Wang, *Nanoscale*, 2017, **9**, 19245-19254.
26. Z. Li, Y. Zhao, H. Liu, M. Ren, Z. Wang, X. Wang, H. Liu, Y. Feng, Q. Lin, C. Wang and J. Wang, *Materials & Design*, 2021, **210**, 110104.
27. W. Li, X. Zhao, T. Huang, Y. Ren, W. Gong, Y. Guo, J. Wang and Q. Tu, *Int J Biol Macromol*, 2021, **191**, 60-70.
28. G. Liu, Y. Li, L. Yang, Y. Wei, X. Wang, Z. Wang and L. Tao, *RSC Advances*, 2017, **7**, 18252-18259.
29. J. Zhu, *Biomaterials*, 2010, **31**, 4639-4656.
30. C. C. Lin and K. S. Anseth, *Pharm Res*, 2009, **26**, 631-643.
31. V. Gribova, F. Boulmedais, A. Dupret-Bories, C. Calligaro, B. Senger, N. E. Vrana and P. Lavalley, *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, **12**, 19258-19267.
32. D. Pranantyo, L. Q. Xu, Z. Hou, E.-T. Kang and M. B. Chan-Park, *Polymer Chemistry*, 2017, **8**, 3364-3373.
33. S. C. Shukla, A. Singh, A. K. Pandey and A. Mishra, *Biochemical Engineering Journal*, 2012, **65**, 70-81.
34. X.-S. Chen, K.-F. Wang, G.-C. Zheng, Y. Gao and Z.-G. Mao, *Process Biochemistry*, 2018, **68**, 22-29.
35. S. M. Kennedy, P. Deshpande, A. G. Gallagher, M. J. Horsburgh, H. E. Allison, S. B. Kaye, D. A. Wellings and R. L. Williams, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2020, **61**, 18.
36. A. Sun, X. He, L. Li, T. Li, Q. Liu, X. Zhou, X. Ji, W. Li and Z. Qian, *NPG Asia Materials*, 2020, **12**.
37. V. Gribova, L. Petit, L. Kocgozlu, C. Seguin, S. Fournel, A. Kichler, N. E. Vrana and P. Lavalley, *Macromol. Biosci.*, 2022, **22**, e2200043.
38. S. Iqbal, A. F. Martins, M. Sohail, J. Zhao, Q. Deng, M. Li and Z. Zhao, *Front. Pharmacol.*, 2022, **13**, 854859.
39. D. M. Lynn and R. Langer, *J. Am. Chem. Soc*, 2000, **122**, 10761-10768.
40. A. Vigue, D. Vautier, A. Kaytoue, B. Senger, Y. Arntz, V. Ball, A. Ben Mlouka, V. Gribova, S. Hajjar-Garreau, J. Hardouin, T. Jouenne, P. Lavalley and L. Ploux, *J Funct Biomater*, 2022, **13**.

41. M. Bawazir, A. Dhall, J. Lee, B. Kim and G. Hwang, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2023, **221**, 112952.
42. S. Kamlungmak, T. Nakpheng, S. Kaewpaiboon, M. A. K. M. Bintang, S. Prom-in, C. Chunhachaichana, T. Suwandecha and T. Srichana, *Biol. Pharm. Bull.*, 2021, **44**, 1707-1716.
43. L. Jourdainne, PhD, Strasbourg, 2007.
44. A. Mutschler, L. Tallet, M. Rabineau, C. Dollinger, M.-H. Metz-Boutigue, F. Schneider, B. Senger, N. E. Vrana, P. Schaaf and P. Lavalley, *Chem. Mat.*, 2016, **28**, 8700-8709.
45. S. M. Derayea and E. Samir, *Microchemical Journal*, 2020, **156**, 104835.
46. F. F. Mohammed, K. M. Badr El-Din and S. M. Derayea, *RSC Adv.*, 2018, **8**, 16269-16277.
47. T. B. Saw, A. Doostmohammadi, V. Nier, L. Kocgozlu, S. Thampi, Y. Toyama, P. Marcq, C. T. Lim, J. M. Yeomans and B. Ladoux, *Nature*, 2017, **544**, 212-216.

Figures complémentaires

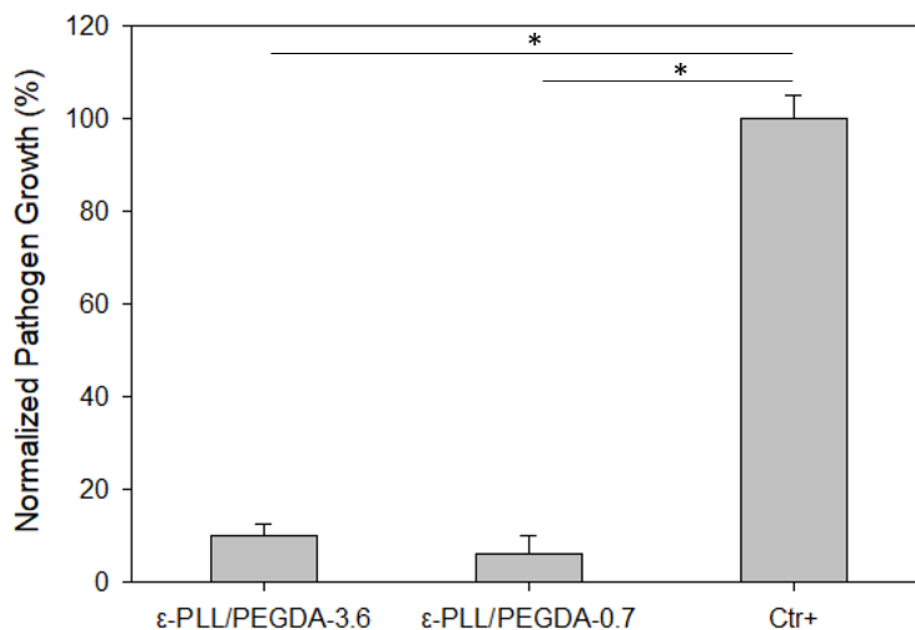


Figure S4.1. Antimicrobial activity of ϵ -PLL/PEGDA-3.6 and ϵ -PLL/PEGDA-0.7 hydrogels poured in compresses on *S. aureus* ATCC25923. The hydrogels were gelled in compresses and then placed directly in contact of the bacteria suspension for 24 h at 37 °C under stirring. The optical density was measured at 595 nm and then normalized with the control (Ctr+) in which bacteria were cultured for 24 h without any hydrogels. The graph represent averages normalized OD_{595nm} of three independent experiments and error bars represent standard error of the mean. * $p < 0.05$.

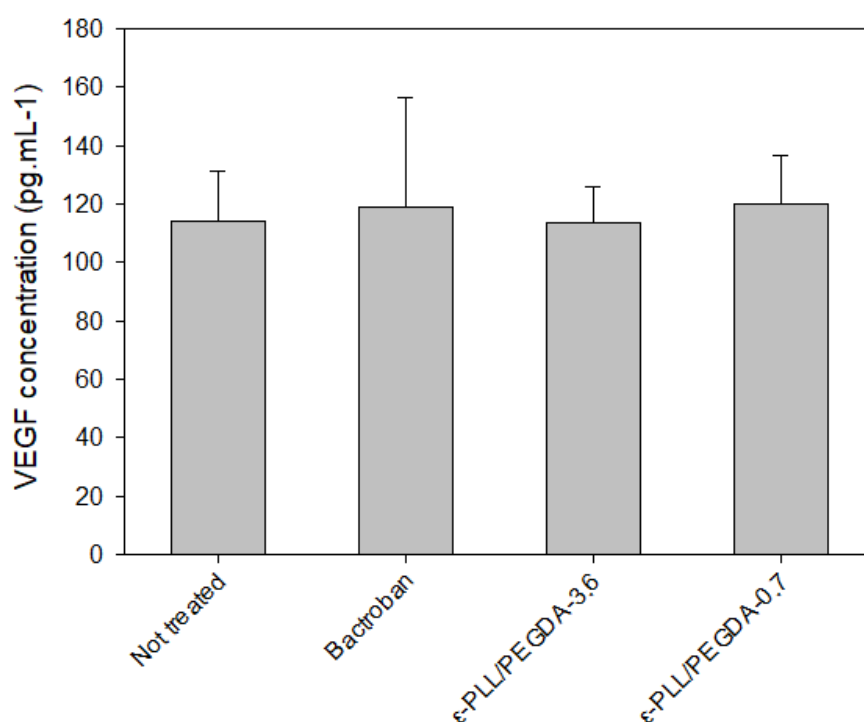


Figure S4.2. VEGF quantification in blood for the different conditions of treatment. The graph presents the mean value for the 7 animal blood and the error bars represent the standard error of the mean. No significant difference was observed between the different conditions.

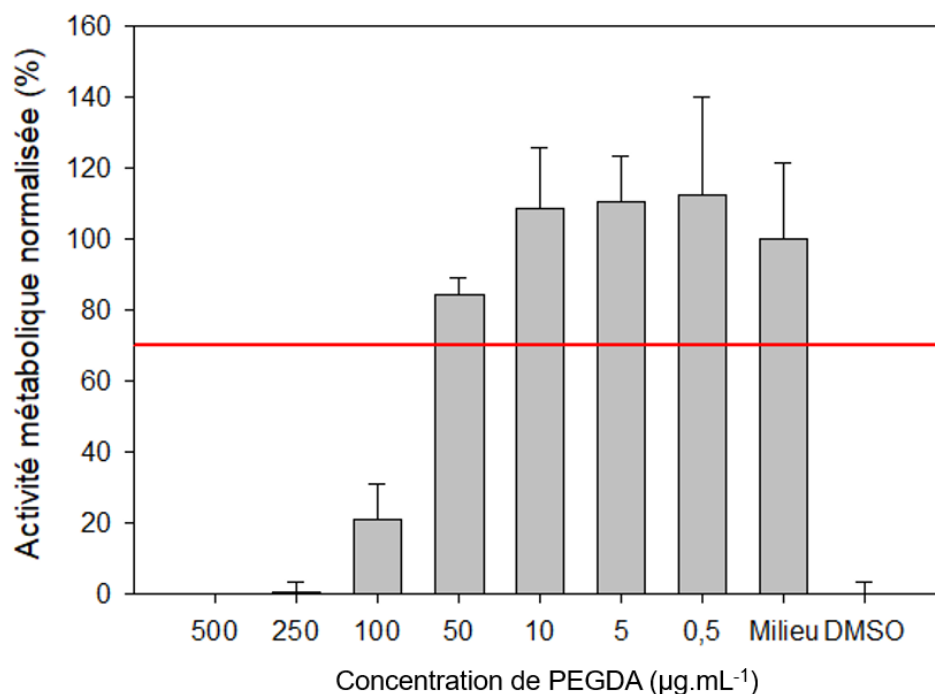


Figure S4.3. Activité métabolique des cellules BALB/3T3 après 24 h de traitement avec différentes concentrations de PEGDA en solution. L'expérience a été réalisée trois fois de manière indépendante et les valeurs représentent les moyennes de ces trois expériences. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne.

Chapitre 5. Hydrogels antibactériens « intelligents » à base de poly(éthylène glycol) thiol et de poly(éthylène glycol) maléimide

Chapitre 5. Hydrogels antibactériens « intelligents » à base de poly(éthylène glycol) thiol et de poly(éthylène glycol) maléimide

5.1. Introduction	210
5.1.1. Les revêtements antibactériens « intelligents »	210
5.1.2. Les hydrogels d'acide hyaluronique chargés.....	211
5.1.3. Les hydrogels de HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal.....	212
5.2. Résultats préliminaires	213
5.2.1. Etude de la déprotection du thiol de la cystéine par un réducteur.....	213
5.2.2. Concentration minimale inhibitrice du polypeptide FITC-PAR10-PC-SH.....	214
5.2.3. Préparation des hydrogels tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal.....	216
5.2.4. Etude de la FITC-PAR10 libérée des hydrogels par mesure de la fluorescence	217
5.2.5. Activité antibactérienne des hydrogels.....	221
5.2.5.1. Activité antibactérienne directe des hydrogels	221
5.2.5.2. Activité antibactérienne des hydrogels extraits avec et sans ajout de GluC dans le milieu d'extraction	223
5.2.5.3. Chargement de ϵ -PLL dans les hydrogels	224
5.3. Conclusion du chapitre.....	227
Bibliographie	230

5.1. Introduction

Les hydrogels précédemment présentés dans le chapitre 4 possèdent des propriétés intéressantes pour des applications biomédicales. Leurs activités antibactériennes et antifongiques sont générées par la dégradation des matériaux dans le milieu. Bien qu'il soit possible de moduler cette dégradation en modifiant les concentrations des polymères ainsi que le ratio entre les amines et les acrylates, il n'est pas possible de contrôler complètement la libération des composés antibactériens. Dans ce chapitre 5, le développement d'un hydrogel « intelligent », c'est-à-dire un hydrogel où la libération des molécules d'intérêt est contrôlée par un stimulus extérieur, a été étudié. Dans le cas de cette étude, le stimulus extérieur est la sécrétion d'une enzyme par une bactérie spécifique. Cet hydrogel permettrait donc également de cibler les bactéries et d'avoir un système spécifique à une bactérie.

5.1.1. Les revêtements antibactériens « intelligents »

Dans son mémoire de thèse préparé au laboratoire, Lorène Tallet a décrit le développement d'un revêtement multicouche de polyélectrolytes construit à base de poly(L-arginine) (PAR) et d'acide hyaluronique (HA) ¹. Un polypeptide antibactérien clivable par une enzyme sécrétée par le *S. aureus* (l'enzyme GluC), a été introduit dans la multicouche pour lui conférer une activité antibactérienne contrôlée. Ce polypeptide est constitué d'un motif PAR de 10 arginines (PAR10), suivi d'une séquence d'acides aminés TLRGGE qui est clivable par la GluC du côté C-terminal de l'acide glutamique E ². Enfin, de l'autre côté de la séquence clivable, un groupement maléimide est ajouté. Ce dernier pourra ensuite réagir avec le polymère PAR de 200 arginines (PAR200) préalablement modifié avec des fonctions thiols (PAR200-SH) via une réaction de Michael. De plus, deux molécules fluorescentes ont été ajoutées de part et d'autre de la séquence clivable : un donneur et un accepteur entre lesquelles un transfert d'énergie est possible (FRET, Florescence Resonance Energy Transfert). Lorsque le donneur, le 5-((2-aminoethy)amino)naphtalène-1-sulfonique (EDANS), est spatialement proche de l'accepteur, l'acide 4-((4-diméthylamino)phényl)azo)benzoïque (DABCYL), un transfert d'énergie a lieu ; les molécules se désexcitent et perdent leur fluorescence. Par contre, si ces deux molécules s'éloignent, alors elles retrouvent leur fluorescence perdue par transfert d'énergie par résonance Förster (FRET) ³. Il est ainsi possible de contrôler le clivage du polypeptide par mesure de la fluorescence. La molécule finale introduite dans les multicouches est de la forme : PAR10(DABCYL)-TLRGGE(EDANS)-PAR200, que l'on notera dans la suite PAR10-PC-PAR200 (« PC » pour peptide clivable).

L'idée générale de ce revêtement est de contrôler la libération des chaînes PAR10-PC-PAR200 de la multicouche. Comme expliqué dans la partie introductive du chapitre 3, les longues chaînes de PAR présentes dans le film sont moins mobiles que les

chaines plus courtes et sont donc difficilement libérées du revêtement. Les chaines plus courtes et plus mobiles, telles que PAR10, seront libérées de la multicouche plus facilement et vont diminuer l'infection et la croissance bactérienne dans le milieu avoisinant le film ⁴. Ainsi, lorsque des bactéries sont proches de la surface, elles sécréteront des enzymes GluC qui vont venir cliver la séquence clivable de la chaîne PAR10-PC-PAR200 peu mobile et libérer les chaines courtes de PAR10. Ces chaines sont capables de sortir de la multicouche et ainsi venir lyser les bactéries, rendant le revêtement antibactérien uniquement en présence de bactéries.

Les premiers résultats obtenus montrent que l'ajout du polypeptide PAR10-PC-PAR200 permet de diminuer fortement la croissance bactérienne dans le milieu par rapport à l'ajout de PAR200 seule. De même, le clivage de la séquence clivable par la GluC a également été démontré. Ce travail a nécessité beaucoup de mise au point et faisait suite à la première étude sur les peptides clivables réalisée au cours de la thèse d'Angela Mutschler. Au cours de cette thèse, un peptide clivable était greffé directement sur les surfaces et les bactéries déclenchaient le clivage et la libération du peptide qui les lysait ensuite. La limite de ce système était liée à la densité maximale de peptides que l'on pouvait greffer sur la surface. Ainsi au cours de la thèse de Lorène Tallet évoquée ci-dessus, le passage à un système de multicouches a permis d'améliorer l'efficacité et d'obtenir des résultats convaincants. Nous avons donc proposé d'utiliser les peptides clivables au sein d'hydrogels (systèmes 3D).

5.1.2. Les hydrogels d'acide hyaluronique chargés

Les résultats prometteurs de l'utilisation du polypeptide clivable présenté ci-dessus dans des constructions multicouches ont été exploités pour le développement d'hydrogels antibactériens. Pour cela, la stratégie mise en place par Varvara Gribova au laboratoire a été de développer des hydrogels d'acide hyaluronique et de les charger avec le polypeptide PAR10-PC-PAR200. En effet, la possibilité de charger ce polypeptide dans des hydrogels d'acide hyaluronique grâce aux interactions électrostatiques entre ce dernier et le polypeptide ⁵. De plus, Gribova *et al.* ont montré l'influence de la taille des chaines de PAR chargées dans les hydrogels sur les propriétés antibactériennes de ces derniers. En effet, les chaines de plus grandes tailles sont difficilement chargées et restent en périphérie de l'hydrogel en raison de leur encombrement stérique qui limite leur diffusion au sein du matériau 3D. De même, la quantité de chaines mobiles sera moins importante que pour une PAR de plus petite taille et donc, de la même manière que pour les multicouches décrites précédemment, l'activité antibactérienne des hydrogels sera diminuée. Ainsi, le polypeptide PAR10-PC-PAR200 ne devrait pas être assez mobile dans l'hydrogel et sa libération devrait être insuffisante pour inhiber la croissance bactérienne. En revanche, en présence de l'enzyme GluC, le polypeptide peut être clivé, peut libérer la PAR10 de l'hydrogel, et donc

améliorer les propriétés antibactériennes du matériau. Un polypeptide non clivable de séquence PAR10-TLRGGGK-PAR200 (noté PAR10-PNC-PAR200, « PNC » pour « peptide non clivable ») a été utilisé comme contrôle. Ce dernier n'est pas clivable par l'enzyme GluC en raison de l'absence d'acide glutamique dans sa séquence. Ce peptide dans l'hydrogel ne devrait donc pas être clivé et donc il n'y aurait pas de libération du peptide PAR10 de l'hydrogel et donc probablement pas d'activité antibactérienne.

L'activité antibactérienne des hydrogels chargés avec les polypeptides clivables et non clivables a été étudiée sur une souche sécrétant une grande quantité de GluC par rapport à une souche standard, la souche *S. aureus* V8. Cependant, les résultats ont montré que les hydrogels chargés avec PAR10-PC-PAR200 et PAR10-PNC-PAR200 présentaient les mêmes propriétés antibactériennes avec une forte diminution de la croissance de *S. aureus* V8 (de l'ordre de 100 % d'inhibition pour les deux polypeptides). Puisque les deux hydrogels présentent des propriétés antibactériennes, il n'est pas possible de prouver que l'activité est due au clivage de la séquence clivable et donc que l'activité antibactérienne peut être contrôlée. En effet, malgré la faible mobilité des polypeptides PAR10-PC-PAR200 ou PAR10-PNC-PAR200 dans l'hydrogel, une activité antibactérienne est tout de même présente. Une nouvelle stratégie avec l'utilisation de nouveaux hydrogels a donc été élaborée.

5.1.3. Les hydrogels de HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal

En parallèle à ces travaux, des hydrogels à base de PEGs linéaires fonctionnalisés avec des fonctions thiols (HS-PEG-SH) et de PEGs 4 bras fonctionnalisés avec des fonctions thiols et des fonctions maléimides (respectivement nommés tetra-PEG-SH et tetra-PEG-Mal) ont été développés par Sarah Zahouani au cours de sa thèse (voir chapitre 2 Matériels et Méthodes pour la structure de ces polymères) ⁶. Ces hydrogels sont réticulés grâce à une réaction de Michael entre les fonctions thiols et maléimides ⁷.

Suite à tous ces différents travaux préliminaires, un nouveau polypeptide a été commandé à Pepmic (Chine) de structure K-FITC-PAR10-TLRGGE-Cys-thiopyridone (FITC-PAR10-PC-SSTP). Une sonde fluorescente FITC a été ajoutée du côté de la PAR10 afin de permettre notamment de quantifier par fluorescence la libération de PAR10 des hydrogels. Le groupement protecteur thiopyridone peut être facilement réduit en groupement thiol afin d'obtenir le polypeptide FITC-PAR10-PC-SH qui pourra être couplé à des chaînes comportant une fonction maléimide.

Des hydrogels tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal ont ensuite été développés en ajoutant le polypeptide FITC-PAR10-PC-SH en amont de la réaction de gélification dans le mélange réactionnel. Grâce à la réactivité de la fonction thiol du polypeptide FITC-PAR10-PC-SH avec les maléimides présents sur le tetra-PEG-Mal, il est possible de lier

de manière covalente le polypeptide au sein du réseau 3D de l'hydrogel. Par construction, ce dernier pourra se libérer uniquement lors de la dégradation du matériau ou bien en présence d'une enzyme capable de cliver la séquence clivable TLRGGE. Ainsi, l'activité antibactérienne des hydrogels sera déclenchée de manière contrôlée, sur le même principe que précédemment, c'est-à-dire que le clivage du polypeptide par l'enzyme GluC sécrétée par *S. aureus* permettra la libération du peptide FITC-PAR10 de l'hydrogel et induira donc la lyse des bactéries présentes dans le milieu. Un schéma explicatif du principe mécanistique est présenté en **Figure 5.1**. Ce chapitre présentera les résultats préliminaires de cette preuve de concept.

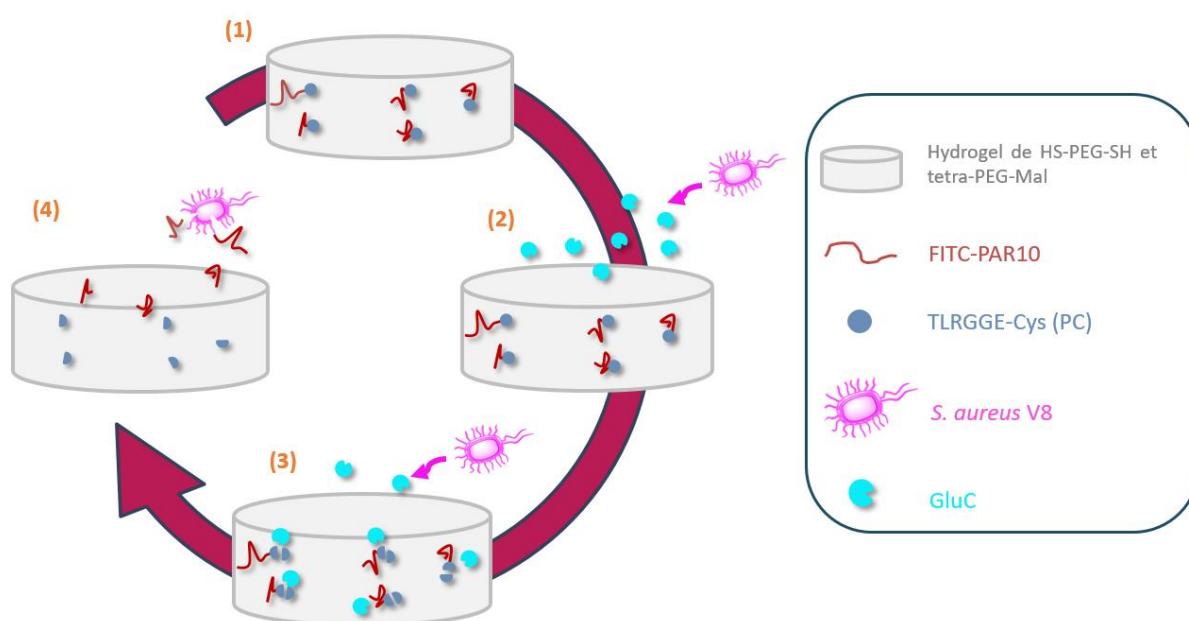


Figure 5.1. Principe du fonctionnement des hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal « intelligents ». L'hydrogel de HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal est préparé en ajoutant le polypeptide FITC-PAR10-PC-SH qui est lié de manière covalente dans l'hydrogel par addition de Michael (1). Ensuite, lorsqu'une bactérie (ici *S. aureus* V8) est présente dans le milieu, elle sécrète naturellement des enzymes, notamment la protéase GluC (2). Cette dernière va venir cliver la séquence clivable au niveau du C-terminal de l'acide glutamique du polypeptide (3). Cela va libérer la partie antibactérienne (FITC-PAR10) du polypeptide qui va venir lyser les bactéries présentes dans son environnement (4).

5.2. Résultats préliminaires

5.2.1. Etude de la déprotection du thiol de la cystéine par un réducteur

Dans un premier temps, la fonction thiol du polypeptide PAR10-PC-SSTP doit être déprotégée afin de pouvoir réagir avec les fonctions maléimides du tetra-PEG-Mal lors de la synthèse de l'hydrogel. Pour cela, un réducteur est utilisé : le tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) ⁸. La

cinétique de la réaction lors de la déprotection du groupement thiopyridone par le TCEP est suivie par une mesure de l'absorbance à 343 nm. Pour cela, 5 μL de TCEP à 2 mg.mL^{-1} sont introduits dans un puits d'une plaque 96 puits contenant 95 μL de polypeptide PAR10-PC-SSTP à une concentration de 1 mg.mL^{-1} . L'absorbance dans le puits au cours du temps est mesurée à une longueur d'onde de 343 nm pendant 20 minutes. La **Figure 5.2.** présente les résultats de cette cinétique. Une augmentation de l'absorbance est observée au cours des 100 premières secondes, ce qui indique que la réaction de déprotection des fonctions thiopyridones par le réducteur est rapide. Ensuite, un plateau est obtenu après 150 secondes. Ainsi, la déprotection des fonctions par le TCEP se fait correctement et en moins de 5 minutes.

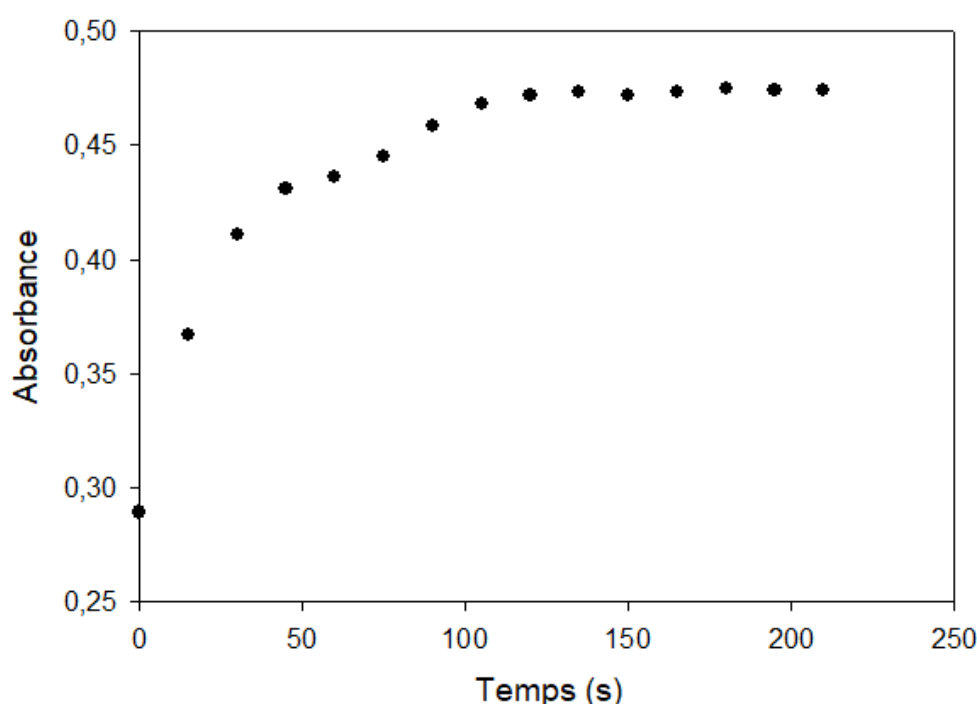


Figure 5.2. Déprotection des groupements thiols par réduction des groupements thiopyridone par le TCEP suivi par spectrophotomètre UV à une absorbance 343 nm. La réaction est terminée après 150 secondes.

5.2.2. Concentration minimale inhibitrice du polypeptide FITC-PAR10-PC-SH

La concentration minimale inhibitrice (CMI) en solution du polypeptide FITC-PAR10-PC-SH déprotégé par le TCEP est ensuite étudiée sur la souche *S. aureus* V8. Cette étude a pour but notamment de connaître la quantité de polypeptide à introduire dans l'hydrogel. La CMI est mesurée de la même manière que dans la partie 2.3.1 du chapitre 2. Des concentrations en polypeptide entre 1 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ont été testées. Les résultats présentés sur la **Figure 5.3.**, d'après la sigmoïde tracée, montrent une CMI de $27.4 \pm 3.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ainsi, la concentration

du FITC-PAR10-PC-SH libéré de l'hydrogel devra être supérieure à cette valeur afin d'observer une inhibition complète (de 100 %) des bactéries dans le milieu.

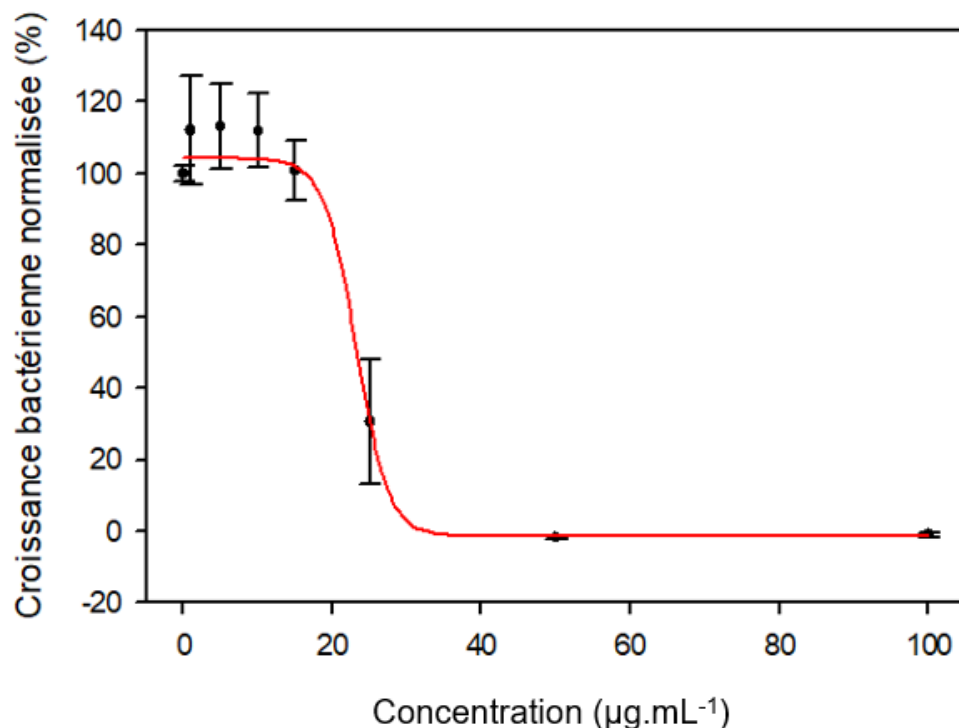


Figure 5.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice du polypeptide FITC-PAR10-PC-SH déprotégé par le TCEP. L'expérience a été réalisée 3 fois de manière indépendantes. Pour chaque expérience, chaque condition a été préparée en triplicat. La CMI est déterminé comme étant la concentration minimale de peptide permettant de diminuer la croissance bactérienne de 95 %, cette concentration étant déterminée à partir de l'équation de la sigmoïde tracée en rouge. Les valeurs présentées sont les moyennes de ces trois expériences et les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne.

De plus, ces résultats concernent le polypeptide FITC-PAR10-PC-SH, c'est-à-dire la version déprotégée du polypeptide, ce qui signifie que du TCEP est présent dans le milieu. Afin de vérifier que ce dernier n'a pas de toxicité sur les bactéries, la CMI du TCEP en solution est également étudiée. Les résultats sont présentés sur la **Figure 5.4**. La croissance bactérienne du *S. aureus* V8 diminue à des concentrations en TCEP supérieures à environ 100 µg.mL⁻¹. Cependant, pour des concentrations inférieures à cette dernière, aucune diminution de la croissance bactérienne n'est observée. Afin de déprotéger les fonctions thiols du polypeptide, une concentration finale de TCEP de 100 µg.mL⁻¹ pour une concentration de polypeptide FITC-PAR10-PC-SSTP de 1 mg.mL⁻¹ est nécessaire (voir **Figure 5.2**). Ainsi, la quantité finale de TCEP dans la solution de polypeptide nécessaire pour inhiber les bactéries est inférieure à la concentration de TCEP toxique pour ces dernières. Il n'y aura donc aucun effet du TCEP sur l'activité antibactérienne des hydrogels développés.

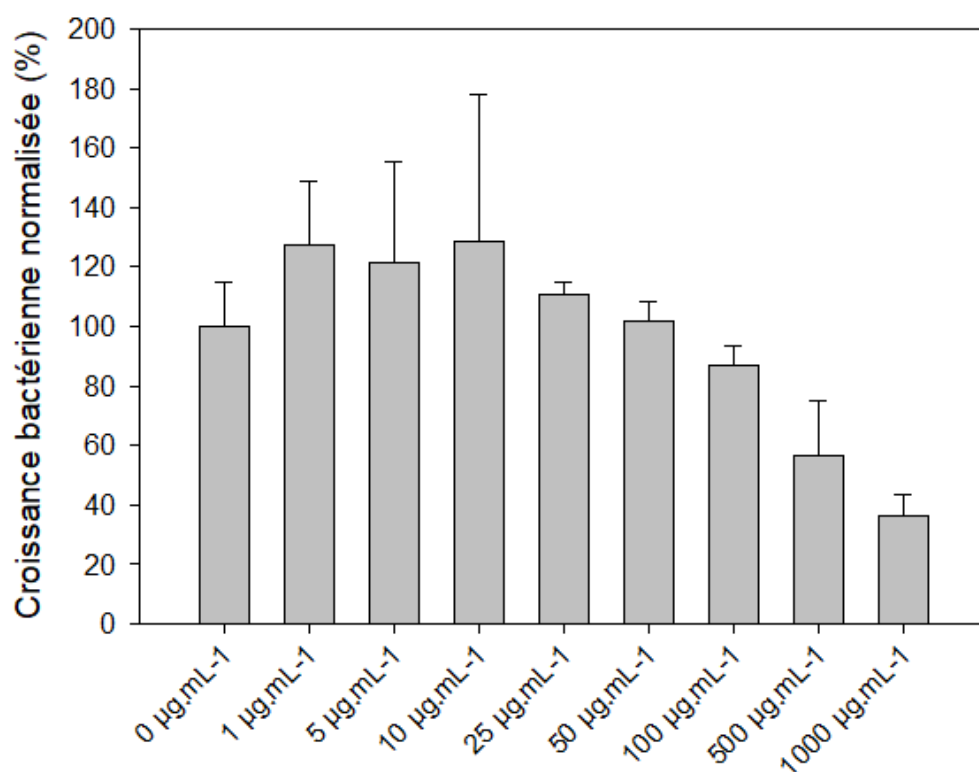


Figure 5.4. Croissance bactérienne normalisée du *S. aureus* V8 en fonction de la concentration de TCEP dans le milieu de culture. Les valeurs représentent la moyenne sur trois puits et les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne.

5.2.3. Préparation des hydrogels tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal

La synthèse des hydrogels est très rapide (seulement quelques secondes) en raison de la forte réactivité des fonctions thiols et maléimides. De plus, en fonction des concentrations en polymères, les hydrogels peuvent avoir des propriétés mécaniques différentes. Pour cette étude, les hydrogels ne doivent pas gélifier trop rapidement afin d'obtenir des structures homogènes. De plus, ils ne doivent pas être trop réticulés afin de faciliter l'accessibilité de l'enzyme au cœur de l'hydrogel, et ainsi permettre la libération d'un nombre suffisant de peptides dans le milieu pour obtenir des propriétés antibactériennes.

Deux types d'hydrogels ont été développés. Les premiers sont synthétisés à partir de tetra-PEG-SH de poids moléculaire 20 kDa solubilisés à une concentration initiale de 100 mg.mL⁻¹ dans de l'eau ultrapure de résistivité de 18 MΩ.cm à 25 °C et de tetra-PEG-Mal de poids moléculaire 10 kDa à une concentration initiale de 100 mg.mL⁻¹ dans de l'eau ultrapure. Les seconds hydrogels ont leur réseau 3D qui est constitué de HS-PEG-SH de poids moléculaire 3.5 kDa à une concentration de 50 mg.mL⁻¹ dans l'eau ultrapure et de tetra-PEG-Mal de poids moléculaire 10 kDa à une concentration de 50 mg.mL⁻¹, également

dans l'eau ultrapure. Dans les deux cas, les deux polymères tetra-PEG-SH / HS-PEG-SH ont été mélangés à un ratio 1 : 1 en volume.

Une fois les concentrations et les polymères sélectionnés pour former l'hydrogel, il s'agissait d'introduire le polypeptide clivable FITC-PAR10-PC-SH dans le réseau. Le but ici est de lier de manière covalente le polypeptide dans l'hydrogel afin de limiter au maximum sa mobilité. De plus, la quantité de polypeptide introduite doit être supérieure à la CMI afin de disposer d'une activité antibactérienne. Le polypeptide à une concentration de 2 mg.mL^{-1} dans de l'eau ultrapure est d'abord introduit dans une solution de tetra-PEG-Mal dans un ratio 1 : 2 en volume. Le mélange est agité pendant 5 minutes afin de permettre la réaction entre les fonctions thiols et maléimides. Ensuite, la solution de tetra-PEG-SH ou de HS-PEG-SH est ajoutée à ce mélange afin de permettre la synthèse de l'hydrogel.

Dans le cas des hydrogels tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal, les fonctions thiols et maléimides étant très réactives, l'hydrogel se forme instantanément. En effet, les deux polymères possédant tous les deux 4 bras et 4 fonctions réactives sur chaque chaîne, il n'est pas nécessaire d'attendre qu'un grand nombre de fonctions réagissent avant d'obtenir un réseau 3D. Cependant, il est difficile d'obtenir des hydrogels homogènes avec ces paramètres.

Pour la synthèse du second hydrogel, le tetra-PEG-SH est remplacé par un polymère linéaire, le HS-PEG-SH (hydrogel mélangeant HS-PEG-SH et tetra-PEG-Mal). Cela permet de réduire la vitesse de la formation de l'hydrogel puisque seules 2 fonctions thiols sont présentes sur chaque chaîne et donc qu'il est nécessaire que plus de fonctions réagissent pour former le réseau 3D. Lorsque le polypeptide FITC-PAR10-PC-SH a été introduit dans la solution de tetra-PEG-Mal, la gélification se fait 2 h après l'ajout du HS-PEG-SH.

5.2.4. Etude de la FITC-PAR10 libérée des hydrogels par mesure de la fluorescence

Dans un premier temps, la libération de la FITC-PAR10 des hydrogels est étudiée au spectrofluorimètre Xenius XC (SAFAS, Monaco).

La première étape a été de suivre la libération du peptide antibactérien par l'hydrogel en mesurant la fluorescence en présence ou non de GluC. La méthode utilisée pour cette étude est présentée dans la partie 2.9. du chapitre 2 de cette thèse. Une fois les hydrogels gélifiés et rincés dans la microplaque conçue par notre prototypiste Karim Benmlih, du tampon phosphate salin (PBS) a été introduit dans les puits et de la GluC à $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ finale dans les puits a été ajoutée. La fluorescence du surnageant a été mesurée au cours du temps. La fluorescence liée à la séquence FITC-PAR10 libérée dans le surnageant en présence de GluC est comparée à la fluorescence lorsque la GluC n'est pas ajoutée dans le surnageant. De plus, des hydrogels ont été incubés dans du PBS contenant de la trypsine comme contrôle. En effet,

la trypsine est une enzyme connue pour catalyser l'hydrolyse des liaisons peptidiques, notamment à proximité d'une arginine ou d'une lysine ⁹. Elle est donc susceptible de cliver entièrement la séquence antimicrobienne et de libérer la sonde fluorescente FITC.

L'évolution de la fluorescence du surnageant et donc de la FITC-PAR10 libérée par les hydrogels tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal a été étudiée pendant 14 h par mesure de fluorescence avec les longueurs d'ondes suivantes $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ et un photomultiplicateur réglé à 600 V. A la fin de l'expérience, tout le surnageant est récupéré et agité, puis une mesure de la fluorescence de ce milieu est effectuée dans une plaque noire de 96 puits (100 μL dans chaque puits). Les résultats obtenus pour les hydrogels tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal sont présentés sur la **Figure 5.5.A** et **Figure 5.5.C**. Dans un premier temps, la **Figure 5.5.A**. présente le suivi cinétique de la libération de la FITC-PAR10 au cours du temps en présence de GluC ou de trypsine dans le PBS. Pour les hydrogels tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal, un signal en dents de scie est observé lors de la cinétique pour les trois conditions. Cela est dû à un problème interne au spectrofluorimètre utilisé et ne sera pas pris en considération lors de l'exploitation des données et la discussion suivante. En présence de trypsine, la fluorescence augmente plus rapidement et fortement que les deux autres conditions avec une augmentation de 20 u.a. après 30 minutes seulement. Une augmentation de la fluorescence est également observée lorsque la GluC est ajoutée dans le PBS, mais cette augmentation est moins importante que celle observée avec la trypsine puisqu'elle est de l'ordre de 7 u.a. après 30 minutes. Cependant, elle est tout de même plus importante que celle observée lorsque l'hydrogel est incubé dans du PBS seul (1 u.a., soit dans le bruit de fond de l'appareil). Ensuite, à la fin du suivi cinétique, la fluorescence mesurée, et donc la FITC-PAR10 libérée par l'hydrogel, en présence de trypsine est beaucoup plus importante que celle mesurée en présence de GluC (50 u.a. dans le cas de la trypsine contre 29 u.a. en présence la GluC), qui est elle-même supérieure à celle observée dans du PBS (17 u.a.) (**Figure 5.5.C**). Ces résultats indiquent, dans un premier temps, qu'une partie des chaines de polypeptides ne sont sans doute pas liées de manière covalente à l'hydrogel. En effet, un signal de fluorescence est observé lorsque l'hydrogel est incubé dans du PBS seul. Dans ce cas, aucune molécule ne permet le clivage de la séquence peptidique et donc aucune libération de la FITC-PAR10 ne devrait être induite par un facteur extérieur. L'ajout de la GluC dans le milieu permet tout de même de libérer une quantité plus importante de FITC-PAR10 par rapport à la quantité libérée dans du PBS seul. Il est ainsi possible de conclure qu'une partie des chaines de FITC-PAR10-PC-SH est clivée par la GluC, bien que cette quantité soit faible en comparaison avec la quantité de chaines FITC-PAR10 libérées lorsque la trypsine est ajoutée dans le milieu.

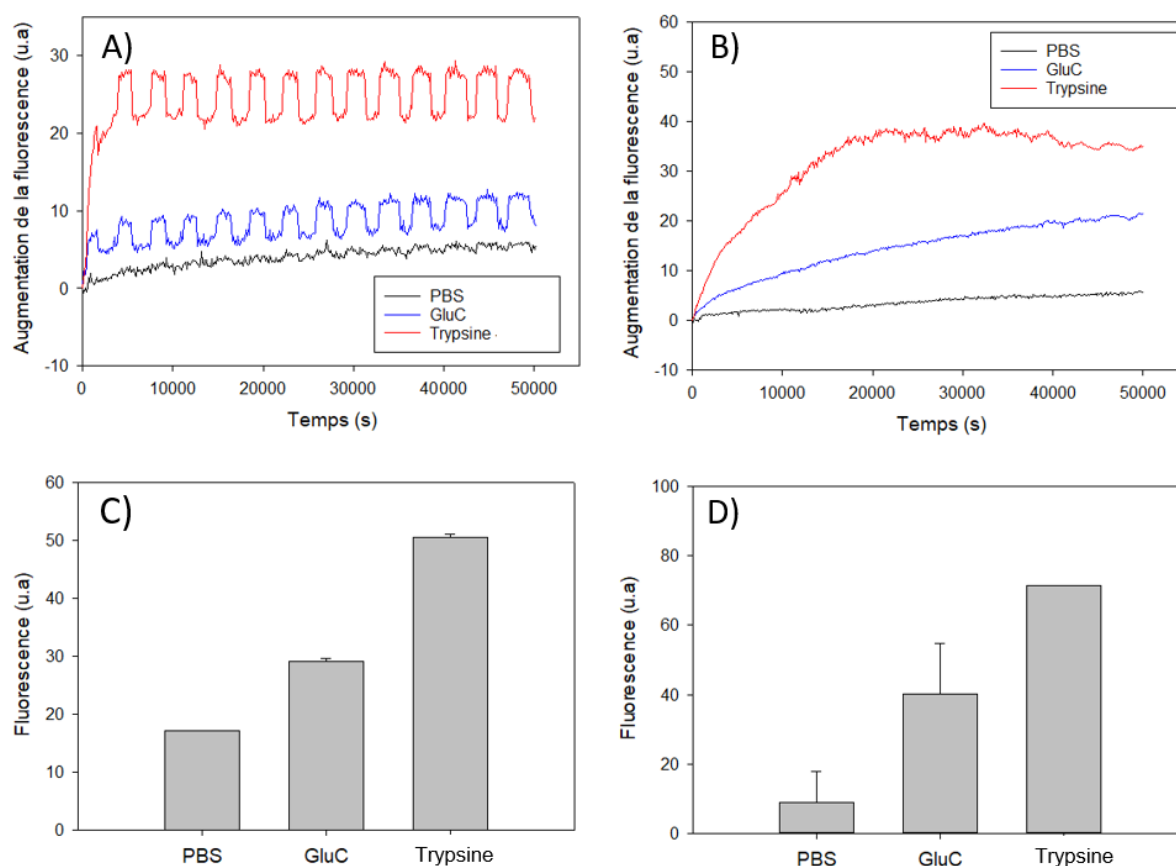


Figure 5.5. Suivi de la quantité de FITC-PAR10 libérée des hydrogels de tetra-EPG-SH / tetra-PEG-Mal (A) et des hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal (B) dans du PBS avec ou sans ajout de GluC et avec ou sans ajout de trypsine au cours du temps. Mesure de la fluorescence finale du surnageant après 24 h d'incubation des hydrogels dans du PBS avec ou sans ajout de GluC et avec ou sans ajout de trypsine pour les hydrogels tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal (C) et pour les hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal (D). Deux puits par conditions ont été étudiés et l'expérience n'a été effectuée qu'une seule fois. Les valeurs représentent les moyennes de la fluorescence des deux puits et les barres d'erreur les écart-types.

La même expérience a été effectuée sur les hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et les résultats sont présentés sur la **Figure 5.5.B.** et la **Figure 5.5.D.** La même tendance que pour les premiers hydrogels est observée avec une augmentation de la fluorescence, et donc de la quantité de FITC-PAR10 libérée, plus importante lorsque de la trypsine est ajoutée dans le PBS (71 u.a. à la fin de l'expérience), que pour les deux autres conditions. La quantité de FITC-PAR10 libérée en présence de GluC est plus importante que lorsque l'hydrogel est placé dans du PBS seul (40 u.a. pour l'hydrogel en présence de GluC contre 9 u.a. dans du PBS en fin d'expérience). Cependant, contrairement à la libération de la FITC-PAR10 par les hydrogels tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal, la libération de la FITC-PAR10 par les hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal semble être tend à être plus lente et plus progressive. L'expérience devra être réalisée une seconde fois pour confirmer la tendance. Une libération

plus lente de la FITC-PAR10 peut être un avantage dans le cas de notre application. En effet, cela permettrait de maintenir l'activité antibactérienne sur un plus long terme et ainsi être plus efficace au cours du temps. Cependant, il est important que cette quantité libérée soit supérieure à la CMI du peptide en solution afin de permettre l'inhibition de la totalité des bactéries dans le milieu. Une quantification de la concentration de FITC-PAR10 libérée a donc été effectuée.

Dans ce but, le polypeptide a été dissout à différentes concentrations entre 5 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans du PBS afin d'établir une gamme d'étalonnage. La fluorescence de ces différentes solutions a ensuite été mesurée au spectrofluorimètre et une droite d'étalonnage est tracée (**Figure 5.6.**).

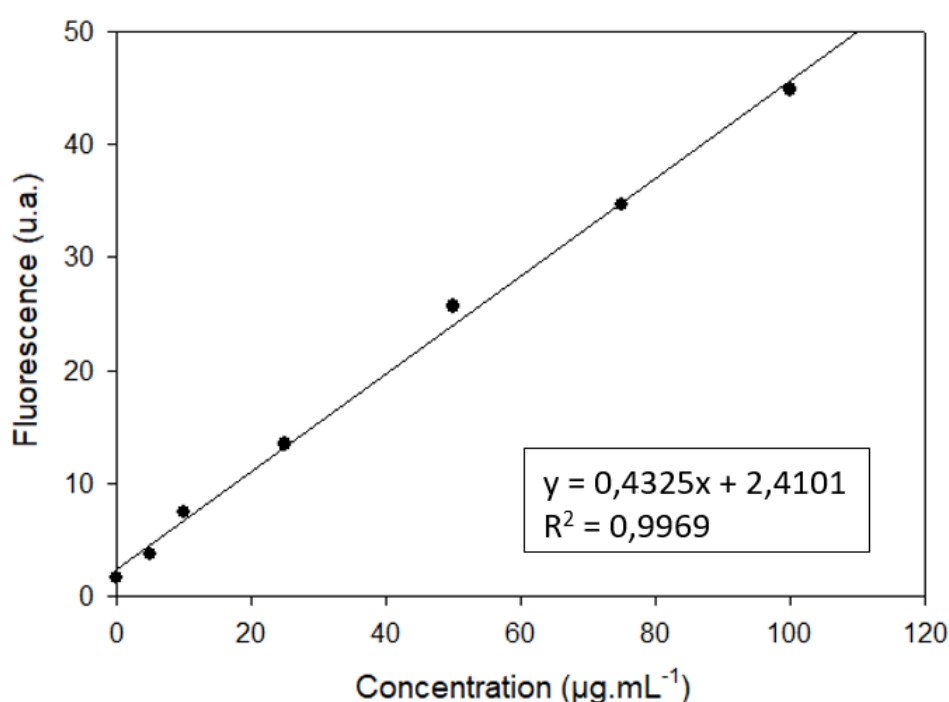


Figure 5.6. Droite d'étalonnage de la fluorescence en fonction de la concentration de FITC-PAR10-PC-SH en solution dans du PBS. $\lambda = 495 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$; $PM = 600 \text{ V}$.

A partir de cette droite, il est possible de quantifier le peptide FITC-PAR10 libéré de l'hydrogel. Les valeurs de fluorescences présentées dans les **Figures 5.5.C.** et **5.5.D.** ont été utilisées afin de quantifier la FITC-PAR10 libérée dans le milieu après 24 h d'incubation. Grâce à l'équation de la droite d'étalonnage, les concentrations de polypeptide FITC-PAR10-PC-SH et / ou de la séquence FITC-PAR10 ont été déterminées (**Tableau 5.1**). La concentration de polypeptides libérés en présence de trypsine est de 110 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour les hydrogels tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et de 159 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour les hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal. En présence de GluC, cette concentration est de 61 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour les premiers hydrogels

et de $87 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour les seconds. Enfin, la concentration libérée des hydrogels tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal dans du PBS est de $33 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et elle est de $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour les hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal. La quantité totale introduite de polypeptide dans les hydrogels est de $100 \mu\text{g}$. Ainsi, la concentration maximale pouvant être libérée dans nos conditions est de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Les concentrations déterminées sont donc bien inférieures à ce maximum. De plus il est à noter que lorsque $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de GluC sont présents dans le milieu, la concentration de FITC-PAR10 libérée par les hydrogels est supérieure à la CMI du polypeptide FITC-PAR10-PC-SH sur *S. aureus* V8, ce qui indique que dans ces conditions, les hydrogels devraient être capables de disposer d'une activité antibactérienne sur *S. aureus* V8. L'activité antibactérienne des hydrogels sera donc vérifiée ci-après sur *S. aureus* V8.

Tableau 5.1. Concentration finale de FITC-PAR10 / FITC-PAR10-PC-SH libérée des hydrogels tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal dans du milieu PBS en présence ou non de GluC ou de trypsine après 24 h d'incubation à 37°C .

	Tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal	HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal
PBS	$33 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$15 \mu\text{g.mL}^{-1}$
GluC	$61 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$87 \mu\text{g.mL}^{-1}$
Trypsine	$110 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$159 \mu\text{g.mL}^{-1}$

5.2.5. Activité antibactérienne des hydrogels

L'activité antibactérienne des hydrogels contenant le polypeptide clivable a été étudiée vis-à-vis de *S. aureus* V8. Tout d'abord, l'activité des hydrogels en contact direct des bactéries a été examinée. Ensuite, l'activité antibactérienne des extraits issus d'hydrogels placés dans du milieu de culture bactérien a été comparée avec celle des hydrogels extraits dans du milieu de culture bactérien contenant de la GluC.

5.2.5.1. Activité antibactérienne directe des hydrogels

Dans un premier temps, l'activité antibactérienne des hydrogels contenant des polypeptides FITC-PAR10-PC-SH a été évaluée sur la souche *S. aureus* V8. Les hydrogels ont été préparés dans des plaques 24 puits et une suspension bactérienne a été ajoutée dans chaque puits comme expliqué dans la partie 2.3.2.1. du chapitre 2. Après 24 h, la densité optique (DO) du surnageant a été mesurée. Les résultats pour les hydrogels tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal sont présentés sur la **Figure 5.7**. Aucune activité antibactérienne vis-à-vis de *S. aureus* V8 ne peut être observée quel que soit l'hydrogel. En effet, la croissance bactérienne est de 107 % pour l'hydrogel HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et de 87 % pour

l'hydrogel tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal. Bien que la quantité de polypeptide FITC-PAR10-PC-SH introduit dans les hydrogels soit beaucoup plus importante que la CMI, la quantité de peptide FITC-PAR10 libérée par les hydrogels est inférieure à la CMI et ne permet donc pas d'inhiber toutes les bactéries (comme présenté dans le **Tableau 5.1.**). Différentes hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce phénomène. La première est que la GluC a des difficultés à pénétrer dans le réseau 3D de l'hydrogel et ainsi n'a pas accès à une quantité suffisante de séquences clivables pour libérer une quantité de peptide antibactérien supérieure à la CMI. La seconde hypothèse est que la quantité de bactéries ajoutées au départ et donc la GluC sécrétée n'est pas suffisante pour libérer assez de FITC-PAR10. En effet, la sécrétion d'enzymes par les bactéries est plus importante à la fin de la phase exponentielle de la croissance de ces dernières ¹⁰. Dans notre cas, les bactériesensemencées au début de l'expérience ne sont pas encore dans cette phase exponentielle et ainsi il est nécessaire d'attendre que les bactéries prolifèrent afin de sécréter une quantité plus importante de GluC. Ensuite, lorsque le nombre de bactéries augmente dans le milieu, la quantité de GluC sécrétée augmente mais le nombre de bactéries est devenu trop important pour que la quantité de polypeptide clivable chargée dans les hydrogels soit suffisante pour inhiber et lyser toutes les bactéries. De même, il est possible que la FITC-PAR10 soit complexée avec du PEG lors de sa sortie de l'hydrogel, la rendant inefficace.

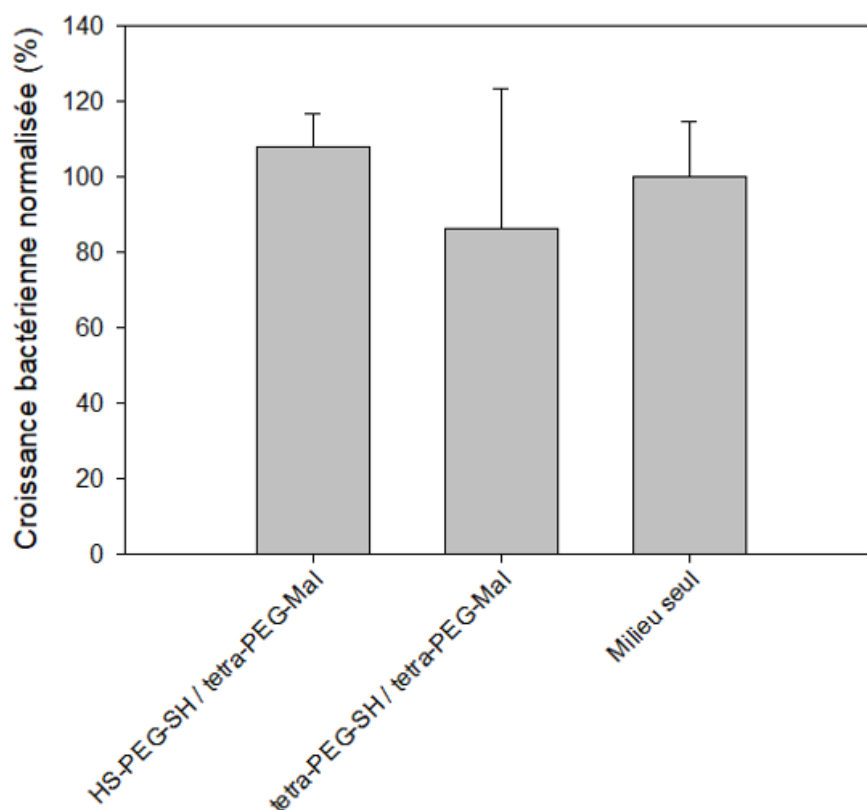


Figure 5.7. *Activité antibactérienne directe des hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal sur S. aureus V8 après 24 h d'incubation avec les hydrogels. La croissance bactérienne dans le milieu après 24 h en contact des hydrogels est comparée avec la croissance bactérienne qui a eu lieu lorsque les bactéries ont été incubées pendant 24 h dans du milieu de culture bactérien. L'expérience a été réalisée trois fois de manière indépendante. Les valeurs présentées sont les moyennes et les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne.*

5.2.5.2. Activité antibactérienne des hydrogels extraits avec et sans ajout de GluC dans le milieu d'extraction

Afin de vérifier la seconde hypothèse, un nouveau test de l'activité a été effectué. Pour ce test, des extraits issus d'hydrogels placés dans du milieu de culture bactérien pendant 24 h ont été produits en présence ou non de GluC. Le protocole complet est décrit dans la partie 2.3.2.2. du chapitre 2.

Après les 24 h d'extraction, les extraits des hydrogels sont mis en contact de bactéries *S. aureus* V8 pendant 24 h. La DO est mesurée dans les puits après ces 24 h. Les deux extraits d'hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal ne présentent pas d'activité antibactérienne, que l'extraction ait été faite en présence ou non de GluC (**Figure 5.8.**). En effet, l'inhibition de la croissance bactérienne par rapport au contrôle où les bactéries ont été cultivées dans du milieu de culture bactérien « seul » est inférieure à 10 % pour les deux hydrogels avec et sans ajout de GluC dans le milieu d'extraction. Ainsi,

l'ajout de GluC pour l'extraction des hydrogels ne permet pas de libérer suffisamment de peptide antibactérien dans le milieu afin d'inhiber la croissance bactérienne. L'hypothèse formulée étant que la quantité de GluC sécrétée par les bactéries n'est pas suffisante pour permettre la libération d'une quantité suffisante de peptide antibactérien n'est donc pas validée. Une solution serait de charger une molécule antibactérienne supplémentaire dans les hydrogels afin d'améliorer les propriétés antibactériennes des hydrogels.

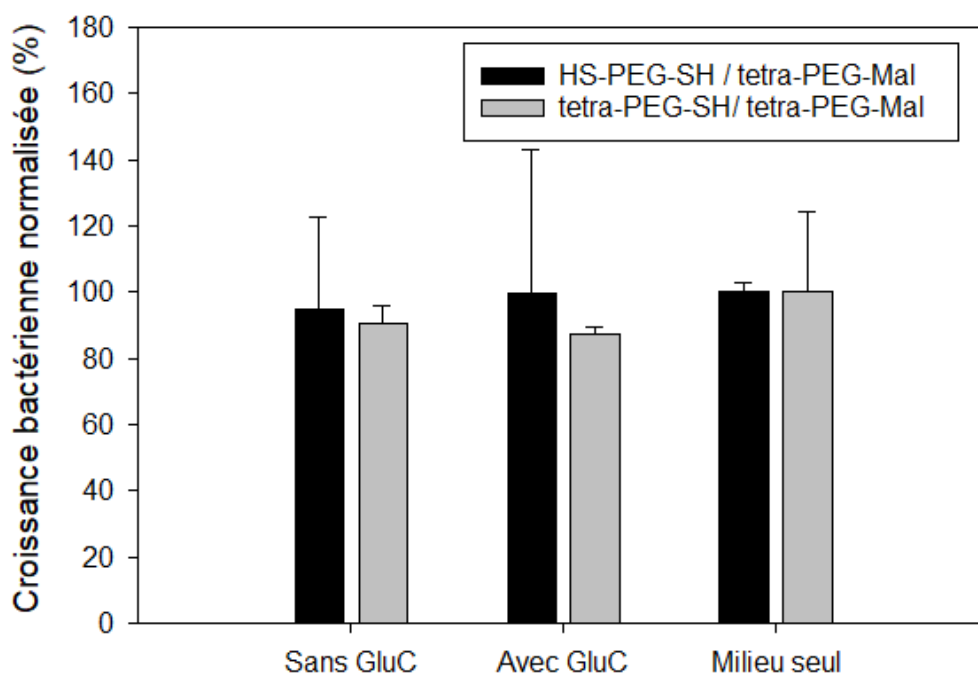


Figure 5.8. *Activité antibactérienne sur S. aureus V8 des hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal extraits dans du milieu de culture avec ou sans ajout de GluC dans le milieu. L'activité antibactérienne a été déterminée après 24 h de culture des bactéries dans les milieux extraits par une lecture de la DO. Les résultats sont comparés à la croissance de S. aureus V8 dans du milieu de culture bactérien seul. L'expérience a été réalisée trois fois de manière indépendante, avec trois puits par conditions à chaque fois. Les valeurs représentées sont les moyennes et les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne.*

5.2.5.3. Chargement de ϵ -PLL dans les hydrogels

Les hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal chargés du polypeptide clivable ne présentent pas d'activité antibactérienne. Ainsi, une nouvelle stratégie consiste à charger de la ϵ -(poly-L-lysine) (ϵ -PLL) dans les hydrogels en plus du polypeptide FITC-PAR10-PC-SH afin d'améliorer les propriétés antibactériennes. En effet, la ϵ -PLL étant moins cytotoxique que la PAR10 pour des propriétés antibactériennes similaires, il est plus intéressant de charger la ϵ -PLL que de la PAR10 libre. Cette étude a été effectuée uniquement sur les hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal. Cependant, afin de montrer que l'activité antibactérienne finale est due à une libération du peptide FITC-PAR10 par l'hydrogel en synergie avec la libération

de ϵ -PLL, la quantité de ϵ -PLL ajoutée doit être inférieure à celle nécessaire pour inhiber complètement la croissance bactérienne. Ainsi, dans un premier temps, la ϵ -PLL a été chargée dans les hydrogels avant gélification. Un volume de 50 μL de ϵ -PLL à différentes concentrations (0, 10, 25, 50, 100 et 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans de l'eau ultrapure) a été ajouté dans des hydrogels de volume 200 μL . L'activité antibactérienne des hydrogels a été évaluée après 24 h de contact sur la souche *S. aureus* V8. Les résultats présentés sur la **Figure 5.9.** montrent que les hydrogels contenant 50 μL de ϵ -PLL à des concentrations inférieures ou égales à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ne présentent pas d'activité antibactérienne puisque la croissance bactérienne n'est pas inférieure à 100 % pour toutes ces conditions. A contrario, les hydrogels contenant 50 μL de ϵ -PLL à 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ permettent d'inhiber 100 % des bactéries. Ainsi, afin de permettre d'améliorer les propriétés antibactériennes des hydrogels contenant le polypeptide, une concentration de ϵ -PLL de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a été choisie.

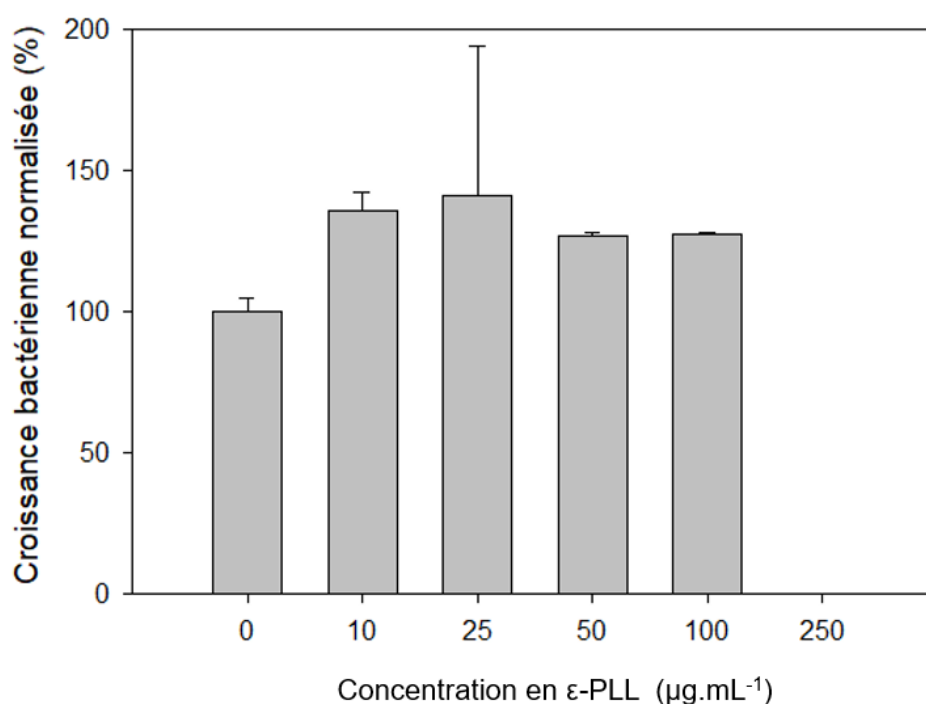


Figure 5.9. Croissance bactérienne de *S. aureus* V8 après 24 h en contact des hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal chargés avec de la ϵ -PLL en amont de la gélification. Les hydrogels ne contiennent pas de polypeptide FITC-PAR10-PC-SH pour cette expérience. L'expérience a été réalisée deux fois de manière indépendante. Les valeurs présentent les moyennes et les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne.

Une fois la concentration de ϵ -PLL déterminée, des hydrogels chargés avec un mélange de ϵ -PLL et de FITC-PAR10-PC-SH ont été synthétisés. Pour ces hydrogels, la ϵ -PLL est mélangée au polypeptide à une concentration finale de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ en ϵ -PLL et de 2 mg.mL^{-1} en FITC-PAR10-PC-SH dans de l'eau ultrapure. Ensuite, 50 μL de ce mélange sont ajoutés à

100 μ L de tetra-PEG-Mal dans des puits d'une plaque de 24 puits, puis 100 μ L de HS-PEG-SH sont ajoutés. Le même protocole que décrit précédemment est suivi pour la suite de l'expérience. Des hydrogels contenant uniquement de la ϵ -PLL à 100 μ g.mL⁻¹ et uniquement le polypeptide FITC-PAR10-PC-SH à une concentration de 2 mg.mL⁻¹ sont également préparés. L'activité antibactérienne des hydrogels extraits dans du milieu de culture bactérien pendant 24 h a été étudiée vis-à-vis de *S. aureus* V8. Lors de la production des extraits des hydrogels, la GluC est ajoutée afin de comparer les résultats avec ceux des extraits d'hydrogels issus d'une incubation dans du milieu de culture sans ajout de GluC. Les résultats sont présentés sur la **Figure 5.10**. Comme montré précédemment, les extraits d'hydrogels contenant uniquement de la ϵ -PLL à 100 μ g.mL⁻¹ ne présentent pas d'activité antibactérienne sur *S. aureus* V8 (inhibition de la croissance bactérienne de 12 %). De même, les extraits d'hydrogels chargés avec le FITC-PAR10-PC-SH et issus d'incubations avec et sans GluC ne sont pas antibactériens (6 % et 1 % d'inhibition respectivement). En revanche, les hydrogels contenant le mélange ϵ -PLL / FITC-PAR10-PC-SH montrent 88 % d'inhibition lorsqu'ils sont extraits dans du milieu de culture sans GluC et 93 % d'inhibition lorsque de la GluC est ajoutée dans le milieu d'extraction. Cette différence n'étant pas significative (test Anova effectué sur SigmaPlot), il n'est pas possible de conclure quant à l'effet de l'ajout de la GluC sur le clivage de la séquence clivable et donc sur la libération de la FITC-PAR10 dans le milieu d'extraction. Cependant, ces résultats permettent de montrer qu'une partie du polypeptide FITC-PAR10-PC-SH est libéré par l'hydrogel lors de l'extraction. En effet, une différence significative (test Anova effectué sur SigmaPlot) entre les hydrogels chargés avec uniquement de la ϵ -PLL ou avec uniquement du polypeptide FITC-PAR10-PC-SH et les hydrogels chargés avec le mélange de la ϵ -PLL et du polypeptide est observée. On obtient ainsi un effet synergique de la ϵ -PLL et du polypeptide FITC-PAR10-PC-SH, mais le rôle de la GluC dans l'activité antibactérienne n'a pas pu être montré.

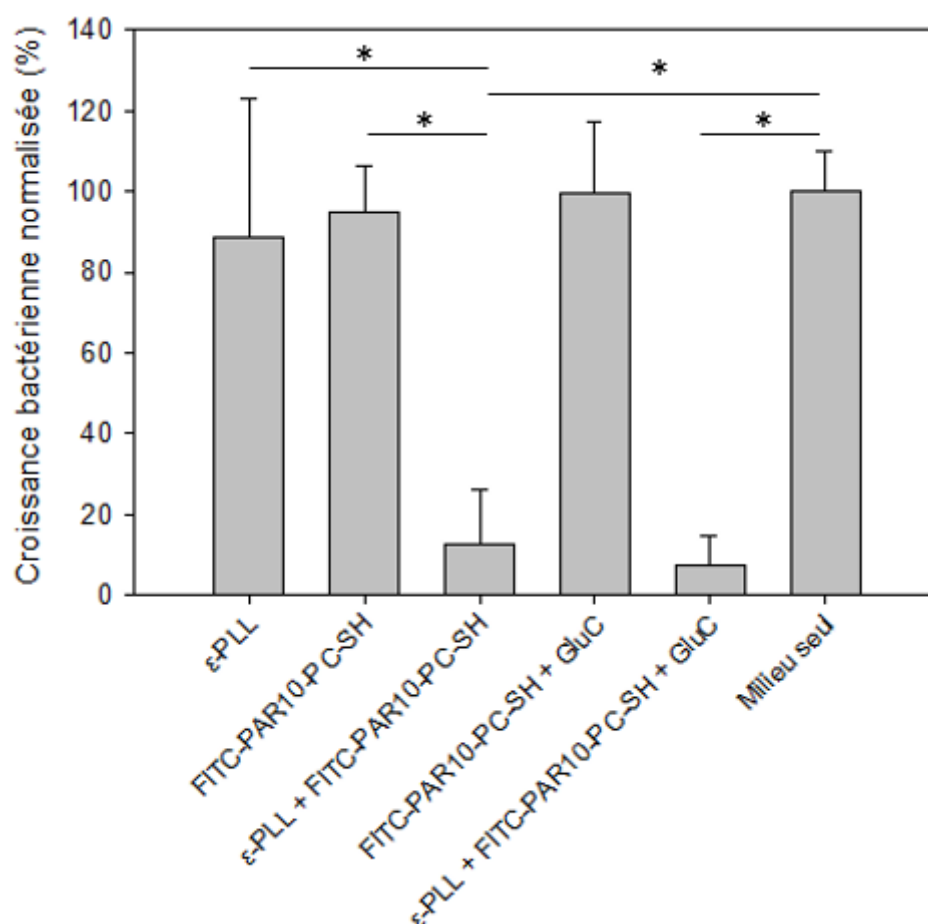


Figure 5.10. Croissance bactérienne de *S. aureus* V8 après 24 h de culture dans du milieu bactérien dans lequel différents hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal chargés ou non de ϵ -PLL et / ou du polypeptide clivable FITC-PAR10-PC-SH ont été extraits. L'extraction des hydrogels contenant le polypeptide et ceux chargés avec le polypeptide et la ϵ -PLL a été réalisée avec et sans GluC afin de vérifier si une différence d'activité était observée et donc déterminer si plus de polypeptide FITC-PAR10-PC-SH a été libéré. L'expérience a été réalisée deux fois de manière indépendante. Les valeurs données sont les moyennes et les barres d'erreurs représentent l'erreur standard de la moyenne. * $p < 0.05$.

5.3. Conclusion du chapitre

Pour conclure, des hydrogels réticulés chimiquement ont été synthétisés à partir de HS-PEG-SH, de tetra-PEG-SH et de tetra-PEG-Mal grâce à la réactivité des fonctions thiols avec les fonctions maléimides. Un polypeptide fonctionnalisé avec une fonction thiol peut être lié de manière covalente au sein du réseau 3D de l'hydrogel. Ce polypeptide est constitué d'un peptide antibactérien, la PAR10, sur lequel une sonde fluorescente est greffée, ainsi que d'une séquence d'acides aminés qui est clivable par une enzyme spécifique, la GluC, sécrétée par la bactérie *S. aureus*. Le principe ici est de développer un matériau « intelligent » répondant à la présence de la GluC et libérant le peptide antibactérien uniquement en présence de

l'enzyme, et donc de la bactérie. Les résultats présentés dans ce chapitre montrent que le polypeptide a bien été lié de manière covalente dans l'hydrogel. Le clivage de la séquence clivable et la libération induite de la FITC-PAR10 ont été mis en évidence par fluorescence, bien que la quantité de polypeptide clivée semble encore trop faible pour permettre la lyse de toutes les bactéries présentes dans un milieu. En effet, aucune activité antibactérienne n'a pu être observée pour les hydrogels contenant uniquement le polypeptide au sein du réseau, et ce, même lorsque l'enzyme GluC est ajoutée dans le milieu afin d'augmenter le nombre de chaînes de FITC-PAR10 libérées.

Afin d'améliorer leurs propriétés antibactériennes, de la ϵ -PLL a été chargée dans les hydrogels en plus de la FITC-PAR10-PC-SH. Cela a permis d'inhiber environ 90 % de bactéries dans le milieu, mais également de montrer qu'une partie de la FITC-PAR10 était libérée par l'hydrogel, puisque l'activité antibactérienne est améliorée lorsque la FITC-PAR10-PC-SH est ajoutée en synergie avec la ϵ -PLL.

Ces résultats sont prometteurs pour la suite, bien que les paramètres utilisés pour le développement des hydrogels nécessitent d'être optimisés afin d'améliorer l'accès de l'enzyme GluC à la séquence clivable. Le problème majeur de cette étude est que la quantité d'enzymes sécrétées par les bactéries doit être suffisamment importante afin de cliver un nombre suffisant de chaînes de polypeptides. Les séquences clivables doivent aussi être accessibles à l'enzyme. Cependant, la quantité d'enzymes produites dépendra surtout du nombre de bactéries présentes au contact de l'hydrogel ainsi que leur phase de croissance (la GluC étant produite en plus grande quantité à la fin de la phase exponentielle). Si ce nombre de bactéries est faible, peu d'enzymes sont produites et donc peu de PAR10 est libérée par l'hydrogel. A contrario, si le nombre de bactéries est trop important, le nombre d'enzymes est grand permettant donc de cliver plus de liaisons peptidiques mais la concentration en PAR10 libérée par l'hydrogel devra être plus importante afin d'inhiber l'infection. Ainsi, il est important pour cette preuve de concept de trouver le bon ratio entre nombre de bactériesensemencées et la concentration de PAR10 nécessaire pour inhiber toutes les bactéries du milieu. Il est à noter que, comme la plupart des études sur les matériaux antimicrobiens, la quantité de bactériesensemencées est toujours très au-delà de ce qui se passe lors de l'initiation d'une infection sur un implant par exemple. Les différentes hypothèses posées ainsi que les tests à réaliser pour répondre à ces dernières sont présentés dans le **Tableau 5.2**.

Tableau 5.2. Tableau récapitulatif présentant les différentes hypothèses posées pouvant expliquer l'absence d'activité antibactérienne des hydrogels HS-PEG-SH / tetra-PEG-Mal et tetra-PEG-SH / tetra-PEG-Mal sur *S. aureus* V8. Différentes expériences testées sont également proposées afin de vérifier l'hypothèse énoncée.

Hypothèse	Expérience à tester
Quantité d'enzymes sécrétées insuffisante	Ajout de l'enzyme GluC ou de trypsine dans le milieu de culture lors du test d'activité antibactérienne
Quantité de polypeptides dans l'hydrogel insuffisante	Gamme de concentrations en polypeptide introduits dans l'hydrogel pour voir l'effet de la concentration sur les propriétés antibactériennes
Séquences clivables inaccessibles pour l'enzyme	Suivi de la libération du polypeptide des hydrogels par fluorescence dans du milieu de culture
Faible diffusion de l'enzyme dans l'hydrogel	Changement des paramètres de formation de l'hydrogel : 1) Poids moléculaire des polymères 2) Concentration des polymères 3) Dissolution des polymères et / ou du polypeptide dans un tampon
Libération du polypeptide sous forme complexée avec les PEGs diminuant l'activité antibactérienne du polypeptide	CMI du polypeptide en présence de polymères HS-PEG-SH, tetra-PEG-SH et tetra-PEG-Mal

Bibliographie

1. L. Tallet, "Revêtement antibactérien intelligent à base de polyarginine et d'acide hyaluronique pour des applications biomédicales", Strasbourg, 2019.
2. S.-G. Chang, D.-Y. Kim, K.-D. Choi, J.-M. Shin and H.-C. Shin, *Biochem. J.*, 1998, **329**, 631-635.
3. J. R. Lakowicz, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, ed. Springer, Springer, 1983, vol. 3, ch. 13, pp. 443-475.
4. A. Mutschler, L. Tallet, M. Rabineau, C. Dollinger, M.-H. Metz-Boutigue, F. Schneider, B. Senger, N. E. Vrana, P. Schaaf and P. Laval, *Chem. Mat.*, 2016, **28**, 8700-8709.
5. V. Gribova, F. Boulmedais, A. Dupret-Bories, C. Calligaro, B. Senger, N. E. Vrana and P. Laval, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2020, **12**, 19258-19267.
6. S. Zahouani, "Développement de nouveaux systèmes enzymatiques mécano-transductifs", Strasbourg, 2017.
7. L. E. Jansen, L. J. Negron-Pineiro, S. Galarza and S. R. Peyton, *Acta Biomater.*, 2018, **70**, 120-128.
8. B. Maret, T. Regnier, J.-C. Rossi, L. Garrelly, L. Vial and R. Pascal, *RSC Advances*, 2014, **4**, 7725.
9. A. Rivera Del Rio, J. K. Keppler, R. M. Boom and A. E. M. Janssen, *Food Funct.*, 2021, **12**, 4570-4581.
10. L. Shaw, E. Golonka, J. Potempa and S. J. Foster, *Microbiology*, 2004, **150**, 217-228.

Conclusion générale et perspectives

Dans un contexte de vieillissement de la population et d'accroissement de l'utilisation des dispositifs médicaux, de nouvelles stratégies, autre que l'utilisation d'antibiotiques, permettant limiter le risque d'infections, sont nécessaires. En effet, l'émergence de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques impose l'étude et le développement de nouvelles molécules antimicrobiennes efficaces sur les pathogènes, engendrant peu de mécanismes de résistance et sans risque pour le microbiote et pour l'environnement. C'est pourquoi, au cours de ce travail de thèse, de nouveaux peptides aux propriétés antimicrobiennes ont été étudiés. Des études préliminaires ont montré que la poly(L-arginine) (PAR) générait une très faible résistance des bactéries en comparaison d'un antibiotique standard (la résistance se développe 15 fois moins rapidement avec la PAR par rapport à la tétracycline sur *S. aureus* par exemple). De plus, la taille des chaînes lors de l'utilisation de cette PAR dans des biomatériaux impacte directement les propriétés antibactériennes du matériau. Au cours de cette thèse, l'impact de la structure 3D des peptides PAR sur les propriétés antibactériennes a été étudié par comparaison d'un peptide PAR linéaire avec des peptides PAR branchés. Dans le chapitre 3, il a pu être montré une différence d'activité en fonction de la structure. Une PAR branchée possédant 4 bras de 5 arginines a présenté de meilleures propriétés antibactériennes sur une souche Gram positif et une Gram négatif que la PAR linéaire possédant le même nombre total d'arginines sur ses chaînes. De plus, une étude de l'interaction des différentes PAR avec la membrane externe des bactéries *S. aureus* et *P. aeruginosa* a été effectuée par modélisation moléculaire. Cette étude a permis de mieux appréhender le mécanisme d'action du peptide sur la membrane bactérienne. Ainsi, il a été montré que le peptide s'adsorbe à la surface de la membrane de la bactérie et interagit avec les têtes polaires des lipides, induisant une déformation de la membrane plus ou moins importante en fonction de la structure du peptide. La déformation la plus importante a été observée lors de l'adsorption du peptide branché possédant 4 bras de 5 arginines. En effet, en comparaison, le peptide PAR linéaire n'induit que très peu de déformation de la membrane, ce qui permettrait d'expliquer le mécanisme d'action des peptides de PAR sur les bactéries Gram positif et Gram négatif. Des études *in vitro* ont également été effectuées afin de mettre en évidence le mécanisme d'action de l'activité antibactérienne des peptides de PAR. Par exemple, l'interaction entre les lipopolysaccharides (composant majeur de la membrane externe des bactéries Gram négatif) et les peptides PAR a pu être mise en évidence.

Afin de compléter ce travail et de comprendre les mécanismes mis en jeu et l'impact de la structure du peptide sur les propriétés antibactériennes, il serait intéressant de mettre en place des tests supplémentaires. Par exemple, la morphologie des bactéries après traitement avec

les peptides pourrait être étudiée par microscopie électronique à balayage ou à transmission. De même, la perméabilité de la membrane pourrait être étudiée par un test de Bradford, ou encore par cytométrie en flux. Bien que la PAR semble responsable d'un dommage physique par lyse membranaire, des études sur l'influence de la PAR sur les voies métaboliques des bactéries pourraient être intéressantes. Les canaux ioniques membranaires pourraient également être endommagés puis perturberaient le métabolisme bactérien.

En parallèle à ce travail, le développement de nouveaux hydrogels biocompatibles et antimicrobiens a été réalisé et ces derniers sont présentés dans le chapitre 4 et 5. Ces hydrogels ont été synthétisés à partir de poly(éthylène glycol) (PEG) et de polypeptides.

Les premiers hydrogels présentés dans le chapitre 4 possèdent un réseau 3D réticulé grâce à une addition de Michael entre les fonctions acrylates d'un PEG diacrylate (PEGDA) et les fonctions amines d'un polymère naturel, la ϵ -poly(L-lysine) (ϵ -PLL). Ces hydrogels, grâce à leur dégradation spontanée et la libération de la ϵ -PLL, ont l'avantage de présenter une activité antibactérienne intrinsèque sur des souches à Gram positif et à Gram négatif. Ces hydrogels sont biocompatibles, notamment grâce à un rinçage au tris(2-carboxyéthyl)phosphine) (TCEP) lors de leur préparation qui permet de réduire les fonctions acrylates n'ayant pas réagi et ainsi de diminuer drastiquement la cytotoxicité des hydrogels. Ces matériaux présentent également des résultats prometteurs pour la cicatrisation des plaies. En effet, la ϵ -PLL semble augmenter la vitesse de migration des cellules sur un modèle de blessure. Une étude *in vivo* a également été réalisée sur un modèle de plaie infectée sur des souris. Malgré l'absence de résultats significatifs, une tendance est observée : le traitement de la plaie avec les hydrogels semble en effet diminuer la gravité de l'infection, sans avoir d'effet néfaste sur les mécanismes de l'inflammation. Enfin, il est possible d'améliorer les propriétés antifongiques, mais aussi les capacités anti-inflammatoires des hydrogels en les chargeant avec de la PAR composée de 10 arginines (PAR10). Le chargement de la PAR10 a été effectué en amont de la gélification, ce qui permet de charger facilement et de manière homogène le peptide dans l'ensemble de l'hydrogel. Ensuite, via la dégradation rapide des hydrogels, il est possible de libérer facilement des molécules actives afin d'améliorer les propriétés des matériaux.

Cependant, certaines méthodes de caractérisation des hydrogels n'ont pas été probantes. Par exemple, il n'a pas été possible de déterminer le nombre de fonctions amines et acrylates ayant réagi lors de la gélification des hydrogels et ainsi connaître le taux de réticulation du matériau, que ce soit par RMN ou par dosage fluorescent. Aussi, de nouvelles méthodes de caractérisation devront être étudiées, telle que la spectroscopie infrarouge. De même, afin de caractériser la microstructure des hydrogels, la microscopie électronique à balayage est envisagée.

Pour aller plus loin, il a pu être montré, dans une étude préliminaire, que ces hydrogels présentaient des propriétés adhésives (environ 0.1 MPa entre deux plaques de verres lors d'un test plan / plan). Ce premier résultat pourrait être intéressant pour l'utilisation de ces hydrogels pour des applications de sutures par exemple. Cependant, pour ce type d'application, un hydrogel injectable serait plus facile d'utilisation. Cela nécessitera d'adapter le temps de gélification des hydrogels afin de pouvoir injecter les solutions séparément non gélifiées et de permettre leur gélification rapidement après leur mélange.

Ces premiers hydrogels présentent donc des propriétés intéressantes pour des applications biomédicales, et plus particulièrement pour le soin de plaies infectées. Toutefois, comme expliqué précédemment, l'activité antibactérienne est générée grâce à la dégradation spontanée des hydrogels. Il est difficile de contrôler dans le temps la libération des molécules d'intérêt. Dans le cas de ces premiers hydrogels, le mode d'action permettra surtout de prévenir l'infection. Le chapitre 5 présente une preuve de concept qui permettrait de contrôler la libération des molécules antimicrobiennes de l'hydrogel par des stimuli envoyés par les bactéries elles-mêmes et qui permettrait également une libération prolongée de l'activité.

Pour cela, des hydrogels, toujours constitués de PEGs, ont été développés. Cependant, dans ce cas, des polymères de PEGs branchés possédant 4 bras fonctionnalisés avec des fonctions maléimides et d'autres avec des fonctions thiols ont été mélangés. Grâce à la forte réactivité entre les fonctions thiols et maléimides, le réseau 3D peut se développer facilement entre les deux polymères. De plus, il est également possible de lier de manière covalente dans le réseau de l'hydrogel un polypeptide possédant une fonction thiol en bout de chaîne. En plus de cette fonction thiol, le polypeptide sélectionné présente une séquence peptidique possédant des propriétés antibactériennes (ici 10 résidus d'arginine, soit PAR10) ainsi qu'une séquence d'acides aminés clivable préférentiellement par la protéase V8 (GluC), une enzyme sécrétée par la bactérie *S. aureus*. L'idée générale est donc de lier de manière covalente le polypeptide dans le réseau 3D de l'hydrogel afin de l'immobiliser, bloquant ainsi l'activité antibactérienne de la PAR10. Ce peptide sera libéré uniquement grâce au clivage de la séquence clivable par l'enzyme GluC. Cette libération sera donc contrôlée puisqu'elle devrait se réaliser uniquement lorsque des bactéries *S. aureus* seront présentes à proximité de l'hydrogel. La libération du peptide antibactérien a été dans un premier temps étudiée par fluorescence en présence ou non de l'enzyme GluC. Les premiers résultats ont permis de montrer qu'une plus grande quantité de peptide antibactérien était libérée en présence de GluC. A la suite de ces résultats prometteurs, l'activité antibactérienne des hydrogels synthétisés a été testée sur la souche *S. aureus*. Malheureusement, aucune activité n'a pu être observée, en raison très certainement d'une trop faible quantité de GluC sécrétée, et donc la concentration de la séquence PAR10 libérée des hydrogels reste inférieure à la concentration nécessaire pour

inhiber toutes les bactéries. Une solution testée pour augmenter l'action antibactérienne des hydrogels a consisté à charger ces derniers avec de la ϵ -PLL pour initier une première activité antimicrobienne. Les résultats ont montré que l'ajout de ϵ -PLL dans les hydrogels possédant déjà le polypeptide dans leur réseau 3D permettait bien de diminuer drastiquement la croissance bactérienne dans le surnageant. Cependant, bien que ces résultats soient prometteurs, la relation entre les propriétés antibactériennes des hydrogels et la présence de l'enzyme GluC à proximité des matériaux n'a pour le moment pas été mise en évidence. Il sera par la suite possible de modifier les paramètres utilisés lors de la synthèse des hydrogels, notamment les concentrations en polymères, afin de permettre une meilleure libération induite du peptide antibactérien.

Ces différents travaux de thèse ont ainsi permis d'apporter une contribution significative sur les connaissances dans le domaine des matériaux antimicrobiens, mais également de proposer de nouvelles stratégies afin de limiter l'utilisation des antibiotiques et freiner l'émergence de souches microbiennes résistantes.

Keywords: hydrogels, infection, biopolymers, antibacterial, antifungal, antimicrobial peptides, « smart » materials