

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

COMPLEXES DE CUIVRE AVEC APPLICATIONS BIOMÉDICALES :  
SYNTHÈSE, CARACTÉRISATION ET INCLUSION DANS DES FILMS  
BIOCOMPATIBLES

THÈSE  
PRÉSENTÉE  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DU DOCTORAT EN CHIMIE

PAR  
LADAN ESMAEILI

NOVEMBRE 2019

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

De nombreuses personnes ont rendu ce travail possible. D'abord, j'aimerais remercier mon superviseur, le professeur M. A. Mateescu, de m'avoir donné la possibilité de travailler dans son groupe. Sa compréhension de ce domaine et son éthique de travail inlassable ont été une immense inspiration. Le fait que sa porte soit toujours ouverte et ses conseils encourageants ont grandement contribué à cette thèse.

Un grand merci aux membres du laboratoire du professeur Mateescu, à savoir le Dr. Pompilia Ispas-Szabo, le Dr. Canh Le Tien pour leur collaborations, et m'avoir donné des conseils et recommandation perspicaces. Merci à tous mes collègues de laboratoire, qui ont été une source d'amitié, de bons conseils et de collaboration.

Je tiens également à exprimer ma gratitude particulière et mes remerciements au Pr. Joanne Paquin pour sa contribution et ses conseils judicieux.

Merci à toutes les personnes avec qui j'ai eu des collaborations productives; Pr. Marius Andruh (Université de Bucarest), Pr. Joshua Byers et Maziar Jafari pour son aide dans la partie électrochimie; la professeure Sophie Lerouge (CHUM) et son groupe pour sa collaboration sur les tests mécaniques.

Je voudrais remercier Marc-André qui m'a beaucoup aidé dans la lecture du français.

Merci également au personnel administratif du département de chimie pour sa gentillesse et sa coopération particulièrement à Sonia Lachance.

Enfin, je voudrais remercier ma famille, Mehrdad et Sania pour vos encouragements, votre patience et votre amour inconditionnel, sans vous je n'aurais pas pu faire ces études.

*À mon père,*

*Et l'esprit de ma mère*

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES TABLEAUX.....	XV
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XVI
RÉSUMÉ .....	XVIII
ABSTRACT.....	XXII
PARTIE I INTRODUCTION	
PRÉAMBULE .....	XXVI
CHAPITRE I LES COMPLEXES DE CUIVRE.....	1
1.1 La chimie du cuivre .....	1
1.1.1 Les ions de cuivre en physiopathologie .....	4
1.2 Le cuivre dans les molécules bio-organiques .....	6
1.2.1 La cytochrome c oxydase.....	9
1.3 Les complexes de cuivre avec des acides aminés.....	10
1.3.1 Généralités sur les complexes à cuivre .....	13
1.3.2 L'histidine .....	16
1.3.3 La L-Sérine.....	22
1.4 Les complexes de cuivre avec de l'urée .....	24
1.5 Les complexes de cuivre thérapeutiquement actifs en tant qu'agents anticancéreux, anti-inflammatoires et antimicrobiens.....	27

CHAPITRE II LES DOMMAGES OXYDATIFS ET LES FACTEURS ANTIOXYDANTS ENDOGÈNES ET EXOGÈNES .....	31
2.1 Le stress oxydatif.....	31
2.1.1 Les sources endogènes de dérivés réactifs oxygénés .....	32
2.1.2 Les sources exogènes d'espèces réactives oxygénés .....	36
2.2 Les antioxydants .....	37
2.2.1 Les antioxydants endogènes.....	39
2.2.2 Les antioxydants exogènes.....	43
2.3 Méthode d'évaluation des antioxydants .....	46
2.3.1 Le DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle).....	48
2.3.2 La DPD (N, N-Diéthyl-p-phénylènediamine).....	49
CHAPITRE III BIOMATÉRIAUX POUR DES APPLICATIONS MÉDICALES.....	51
3.1 Concept de biomatériaux .....	51
3.2 Les polymères intelligents, ' <i>smart polymers</i> ' .....	54
3.3 Les hydrogels.....	55
3.4 L'alcool polyvinylique.....	56
3.4.1 Synthèse et propriétés chimiques .....	56
3.4.2 Méthodes de réticulation pour la préparation d'hydrogels.....	58
3.4.3 Méthodes de réticulation chimique .....	59
3.4.4 L'irradiation .....	60
3.5 Association de l'alcool polyvinylique avec d'autres polymères pour améliorer des applications médicales.....	60

3.6	Le chitosane .....	64
3.6.1	Propriétés et applications .....	65
3.6.2	Méthodes de réticulation .....	68
3.7	Les films médicamenteux comme vecteurs d'agents actifs .....	72
CHAPITRE IV PRÉSENTATION DU PROJET DE THÈSE .....		78
PARTIE II SECTION EXPÉRIMENTALE		
CHAPITRE V MATÉRIEL ET MÉTHODES .....		84
5.1	Synthèse et caractérisation des complexes à cuivre .....	84
5.1.1	Synthèse de complexes de cuivre .....	85
5.1.2	Caractérisation structurale .....	85
5.1.3	Stabilité dans différents milieux .....	87
5.1.4	Capacité antioxydante .....	87
5.1.5	Culture cellulaire neuronale et traitement avec complexes à cuivre .....	89
5.1.6	Viabilité cellulaire .....	90
5.2	Synthèse, caractérisation et évaluation des films à base de PVA .....	91
5.2.1	Matériels et méthode de préparation des films composites .....	91
5.2.2	Caractérisation des films .....	94
CHAPITRE VI RÉSULTATS .....		102
6.1	Des complexes de cuivre pour des applications biomédicales : étude structurale, activité antioxydante et compatibilité neuronale .....	102
6.1.1	Analyse chimique des complexes de cuivre .....	102
6.1.2	Étude cristallographique par diffraction de rayons X des structures des complexes de cuivre .....	103

6.1.3	Caractérisation FTIR des ligands et des complexes de cuivre .....	107
6.1.4	Stabilité des complexes de cuivre dans des milieux physiologiques simulés.....	109
6.1.5	Capacité antioxydante <i>in vitro</i> .....	115
6.1.6	Biocompatibilité des complexes et ligands de cuivre .....	119
6.2	Synthèse et caractérisation des films d'alcool polyvinylique, de chitosane et composites modifiés par co-réticulation avec la génipine et le STMP.....	121
6.2.1	Microscopie électronique à balayage (MEB).....	122
6.2.2	Analyse FTIR .....	123
6.2.3	Analyse thermogravimétrique (TGA) .....	126
6.2.4	Analyse des films par calorimétrie différentielle à balayage .....	128
6.2.5	Diffraction des rayons X .....	129
6.2.6	Propriétés mécaniques.....	130
6.2.7	Absorption de fluide.....	133
6.2.8	Comportement de dissolution (désintégration) .....	138
6.2.9	Dosage de biocompatibilité.....	140
6.3	Films composites à base d'alcool polyvinylique et de chitosane modifiés par co- réticulation pour la libération contrôlée des médicaments .....	146
6.3.1	Microscopie électronique à balayage (MEB).....	146
6.3.2	Analyse DSC.....	148
6.3.3	Libération <i>in vitro</i> du médicament .....	149
	CHAPITRE VII DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS .....	153
7.1	Caractérisation structurale des complexes à cuivre(II).....	155

7.2	La stabilité des complexes à cuivre(II) dans des milieux physiologiques.....	155
7.3	Capacité antioxydante <i>in vitro</i> .....	157
7.4	Biocompatibilité de l'histidine, serine, urée, biuret et de leurs complexes de cuivre(II).....	158
7.5	Caractérisation et évaluation des films polymériques réticulés.....	159
7.6	Conclusions .....	165
ANNEXES A CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES DURANT LE PROJET DE DOCTORAT.....		
169		
A.1	Participation comme première auteure principale d'un article publié dans Journal of Inorganic Biochemistry (2019), vol.192, p. 87-97. ....	169
A.1S	Données supplémentaires à l'article publié « copper complexes for biomedical application : structural insights, antioxidant activity and neuron compatibility» .....	181
A.2	Participation comme première auteure à des manuscrits en préparation pour soumission.....	185
ANNEXES B RÉSUMÉS PUBLIÉS DES COMMUNICATIONS ORALES ET PAR AFFICHES .....		
186		
ANNEXES C DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES AU SOUS-CHAPITRE 6.2 SUR LES CARACTÉRISATIONS DES MATRICES COMPOSITES PVA-CHITOSANE.....		
192		
BIBLIOGRAPHIE .....		
194		

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Figure 1.1 Régulation cellulaire des niveaux de cuivre. ....	4
Figure 1.2 Coordination du cuivre dans la céruloplasmine.....	8
Figure 1.3 Coordination sur des fonctions des chaînes latérales des acides aminés. ....	11
Figure 1.4 L'effet Jahn-Teller sur l'organisation des ligands dans des complexes. ....	14
Figure 1.5 Rayon atomique des métaux de la série d. ....	16
Figure 1.6 Structure de l'histidine (a) et du complexe [Cu(His) <sub>2</sub> ] (b).....	17
Figure 1.7 Représentation schématique du site actif de CuZn-SOD.....	18
Figure 1.8 Différentes structures des complexes de cuivre-histidine obtenues par diffraction des rayons X.....	20
Figure 1.9 Structure cristalline aux rayons X du complexe ML <sub>2</sub> .....	21
Figure 1.10 Spectroscopie des rayons X au seuil K du Zn, Cu, Ni, Co et Mn des cinq solutions Métal / Histamine. ....	22
Figure 1.11 Structure de la sérine.....	23
Figure 1.12 Structures optimisées de la L-Ser et de ses complexes métalliques. ....	23
Figure 1.13 Structure (a) de l'urée et (b) du biuret.....	24

Figure 1.14 Les modes de coordination de l'urée avec les ions métalliques. ....	26
Figure 2.1 Réactions rédox des radicaux.....	32
Figure 2.2 Métabolisme d'espèces réactives de l'oxygène. ....	34
Figure 2.3 Mécanismes des réactions de Fenton et Haber-Weiss. ....	35
Figure 2.4 Représentation schématique de la réaction de Fenton. ....	36
Figure 2.5 Antioxydants endogènes et exogènes. ....	39
Figure 2.6 Les principales fonctions de protection du glutathion contre le stress oxydatif. ....	40
Figure 2.7 Mécanisme commun de piégeage de l'O <sub>2</sub> • <sup>-</sup> par les SOD.....	42
Figure 2.8 Structures des principaux antioxydants endogènes et exogènes.....	44
Figure 2.9 Structure de la molécule de vitamine E (a) et du Trolox® (b). ....	45
Figure 2.10 Mécanismes d'un antioxydant réagissant avec les radicaux libres.....	47
Figure 2.11 Principe de la méthode colorimétrique DPPH. ....	49
Figure 2.12 Principe de la méthode colorimétrique DPD .....	50
Figure 3.1 Différents types de biomatériaux. ....	52
Figure 3.2 La production de PVA.....	57
Figure 3.4 Structures chimiques de polymères naturels.....	63
Figure 3.5 Structure du chitosane à différents pH.....	65
Figure 3.6 Structure d'un hydrogel à base de chitosane préparé par réticulation covalente. ....	69
Figure 3.7 Mécanisme de réticulation du chitosane avec glutaraldéhyde .....	70

Figure 3.8 Mécanisme de réticulation de chitosane avec la génipine. ....	71
Figure 3.9 Sites pour l'application de film pour la muqueuse buccale et sublinguale. ....	75
Figure 3.10 Le principe (A) et l'appareil de livraison transdermale de médicament (B). ....	76
Figure 4.1 Présentation schématique du projet de thèse. ....	82
Figure 5.1 Différenciation des cellules P19 en cellules neuronales. ....	89
Figure 5.2 Différenciation des cellules en neurones : traitement du J4. ....	90
Figure 5.3 Test de viabilité MTT sur des neurones P19. ....	97
Figure 6.1 Structure de $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ bidenté (A) et $[\text{Cu}(\text{His})_2]$ tridenté (B). ....	104
Figure 6.2 Structures obtenues par diffraction des rayons X pour $[\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2]$ ....	105
Figure 6.3 Spectres FTIR des différents complexes. ....	107
Figure 6.4 Spectres d'absorbance UV-Vis des complexes à cuivre. ....	111
Figure 6.5 Résultats de voltamétrie cyclique des complexes à cuivre. ....	113
Figure 6.6 Évolution de l'absorbance des complexes à cuivre dans le temps et dans l'eau et différents fluides physiologiques simulés. ....	114
Figure 6.7 Capacité de piégeage de ROS des complexes de cuivre et des ligands libres déterminée par la méthode avec DPD. ....	117
Figure 6.8 Capacité de piégeage des radicaux libres des complexes de cuivre et des ligands libres évaluées par le test DPPH. ....	118

Figure 6.9 Viabilité cellulaire en présence de différentes concentrations de complexes de cuivre et de ligands. ....	120
Figure 6.10 Micrographies MEB.....	122
Figure 6.11 Spectres FTIR des films de PVA-Ch.....	124
Figure 6.12 Spectres FTIR des différents films. ....	125
Figure 6.13 Courbes TGA (et les dérivées DTG, dans l'onglet) pour les films à base de PVA et Ch. ....	126
Figure 6.14 Courbes de calorimétrie différentielle des films natif et composites PVA-Ch (3-1).....	128
Figure 6.15 Diffractogrammes des différents films .....	130
Figure 6.16 Courbe contrainte-déformation pour les différents films.....	132
Figure 6.17 Taux d'absorption d'eau pour des films de PVA et de PVA-Ch .....	135
Figure 6.18 Absorption de fluides à différents pH par les films. ....	137
Figure 6.19 Courbes de dissolution pour différents films à 37 °C et à pH 7.2 pendant 96 h. ....	139
Figure 6.20 Micrographies des cellules P19 en culture.....	142
Figure 6.21 La viabilité cellulaire en présence de PVA-Ch (3-1) (réticulé ou non), chargé avec [Cu(His) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] (250µM) .....	143
Figure 6.22 Viabilité cellulaire en présence des films PVA-Ch (3-1)/ M2 et de PVA-Ch (3-1)/ M3.....	145
Figure 6.23 Microscopie des films. ....	147

Figure 6.24 Courbes de calorimétrie différentielle des films natifs et composites.....	148
Figure 6.25 Relargage de médicament par les films composites à 37 °C, pH 7.2 ..	150
Figure 6.26 Relargage d'acétaminophène par les différents films à 37 °C, pH 2.1 et pH 7.2.....	151
Figure S.1 UV-Vis absorbance spectra of [Cu(His) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] [A], [Cu(Ser) <sub>2</sub> ] [B], [Cu(Úrea) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] [C], and [Cu(Biuret) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] [D] in different physiologically-relevant media.....	183
Figure S.2 Time course of absorbance values of the complexes in different physiologically-relevant media, at their $\lambda_{\text{max}}$ and 37 °C.....	184
Figure S.3 B) PVA-Ch (3-1) (a) PVA-Ch/M1 (sans traitement avec Gp) Gp de 0 % m/v (b) PVA-Ch/M2 GP de 0.01 % m/v; (c) PVA-Ch/M2 (Gp de 0.05 % m/v) et (d) PVA-Ch/M2 (Gp de 0.1 % m/v).....	192

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
Tableau 1.1 Enzymes reconnues dépendantes du cuivre et leur fonctions biochimiques.....	7
Tableau 3.1 Différents polymères pouvant être associés avec l'alcool polyvinylique. ....	62
Tableau 5.1 Compositions des films selon différentes méthodes. ....	93
Tableau 5.2 Composition des films composites PVA:Ch. ....	94
Tableau 6.1 Données analytiques et physiques des complexes de Cu(II) avec Ser, His, Urée et Biuret. ....	103
Tableau 6.2 Longueurs des liens pour [Cu(Urea) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ].....	106
Tableau 6.3 Caractéristiques structurales de la première sphère de coordination du cuivre pour les quatres complexes. ....	106
Tableau 6.4 L'épaisseur, la résistance à la traction, l'allongement maximal à la rupture et le module d'élasticité des films.....	133
Tableau S.1 Crystal data and structure refinement for [Cu(Ser) <sub>2</sub> ] and [Cu(Urea) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ].....	181

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABTS•	Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (forme de radical)
ADP	Adénosine diphosphate
AH, BH	Antioxydant
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
AO	Amine oxydases
AR	Acide rétinoïque
ATP	Adénosine triphosphate
CAT	Catalase
CCO	Cytochrome c oxydase
Ch	Chitosan
CP	Céruloplasmine
CUPRAC	Capacité antioxydante réductrice cuivrique
DAO	Diamine oxydase
DPD/DEPDA	N,N-diéthyl-p-phénylènediamine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPH	2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl
DSC	Calorimétrie à balayage différentiel
EDL	Enthalpie de dissociation des liaisons
ELS	Electrolyse
EtOH	Éthanol
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
Gp	Génipine
GA	Glutaraldéhyde
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion disulfure (oxydé)
HAT	Transfert d'atomes d'hydrogène
HBS/G	Solution tampon HEPES enrichie en D-glucose
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
His	L-Histidine
IP	Potential d'ionisation
J	Jour
KH	Tampon Krebs Henseleit
KH ELS	Tampon « Krebs Henseleit » électrolysé
LDH	Lactate déshydrogénase

LOO•	Radical peroxyde
MEB	Microscope électronique à balayage
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényle tetrazolium
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (réduit)
NH <sub>3</sub>	Ammoniac
NO•	Monoxyde d'azote
NR	Neutral Red
•O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anion superoxyde
•OH	Radical hydroxyle
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxygène singulet
PBS	Tampon phosphate
Pm	Picomètre
PRIF	Pouvoir de réduction des ions ferriques
PVA	Alcool polyvinylique
ROS	Espèces réactives d'oxygène
RN	Colorant Rouge Neutre
RLO	Radicaux libres d'oxygène
SAO	Aminé oxydase sérique
Ser	L-Serine
SGF	Fluide gastrique simulé
SH	Solutions salines hypertoniques
SIF	Fluide intestinal simulé
SNB(-AO)	Milieu neurobasal supplémentaire sans antioxydant
SNB	Milieu neurobasal supplémentaire
SNC	Système nerveux central
SOD	Superoxyde dismutase
STMP	Trimétaphosphate de sodium
TAH	Transfert d'atomes d'hydrogène
TE	Transfert d'électrons
TEAC	Capacité antioxydante équivalente de Trolox
TGA	Analyse thermogravimétrique
TGN	Réseau trans-Golgi Network
TMD	Température maximale de décomposition
Vit E	Vitamine E

## RÉSUMÉ

Les complexes d'acides aminés avec du cuivre synthétisés il y a plusieurs décennies, également connus sous le nom de «combinaisons internes» ont suscité une attention croissante au cours des dernières années, en particulier pour leur potentielles applications biomédicales, l'un des plus importants agents chélateurs du cuivre est l'acide aminé L-histidine (His). Le cuivre (II) lié à His représente un pool échangeable de cuivre(II) avec l'albumine dans le sang. La dérégulation du métabolisme du cuivre entraîne diverses maladies. Les propriétés de transport du complexe histidine cuivre(II) ont abouti à son application dans le traitement de la maladie de Menkes, considérée comme mortelle au cours de la première décennie de vie de l'enfant. Cependant, l'administration quotidienne injectable de ce complexe en complique l'utilisation et d'autres voies d'administration sont souhaitables. Par conséquent, l'isolation de l'histidine de cuivre(II) à l'état solide peut être utile pour une meilleure formulation orale et pour l'administration transdermique dans diverses maladies liées au cuivre.

Le présent projet de doctorat propose d'ouvrir de nouvelles fenêtres sur l'utilisation des complexes de cuivre dans les applications biomédicales et pharmaceutiques, en mettant l'accent sur la préparation d'un nouveau composite avec de l'alcool polyvinylique et du chitosane, avec différents agents de réticulation en tant que film pour une potentielle administration contrôlée du complexe.

Le cuivre coordonné avec les ligands d'acides aminés est essentiel au fonctionnement de nombreuses protéines. De plus, le cuivre complexé avec des acides aminés pour libérer le cuivre, sous le nom de  $[\text{Cu}(\text{His})_2]$ , est utilisé dans le traitement de la maladie

neurodégénérative de Menkes et de la cardioencéphalomyopathie. Ce projet de thèse visait à coordonner le cuivre(II) avec quatre petits ligands (L-Sérine, L-Histidine, Urée et Biuret) et à évaluer la stabilité, l'activité antioxydante et la compatibilité neuronale des complexes résultants. Les complexes ont été synthétisés avec du  $\text{CuCl}_2$  et cristallisés par précipitation dans l'alcool. Leurs caractéristiques structurales ont été évaluées par analyse élémentaire, diffraction des rayons X (DRX) et spectroscopie infrarouge (FTIR). Leur stabilité a été évaluée par des profils d'absorbance UV-Vis dans l'eau, des solutions salines physiologiques, gastriques et intestinales, et par voltamétrie cyclique. La capacité antioxydante a été mesurée à l'aide de méthodes DPPH (1,1-diphényl-2,2-picrylhydrazyle) et DPD (N, N-diéthyl-p-phénylènediamine), et la compatibilité neuronale a été évaluée par des mesures de viabilité cellulaire à l'aide de cultures de neurones dérivés de cellules souches de souris P19. Les complexes étaient sous la forme de  $[\text{Cu}(\text{ligand})_2]$  et présentaient une coordination tridentée (L-Histidine), bidentée (L-Sérine et Biuret) ou monodentée (Urée) avec le cuivre. Tous les complexes et leurs ligands avaient une capacité antioxydante, le complexe  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  étant le plus puissant. Contrairement à  $[\text{Cu}(\text{urée})_2\text{Cl}_2]$  et  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$ , les complexes  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  et  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  étaient stables dans différents milieux, notamment l'eau, le sérum physiologique simulé et des solutions analogues à celles de l'intestin. Bien que seul  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  ait présenté une bonne neurocompatibilité (environ 90 % à des concentrations allant jusqu'à 200  $\mu\text{M}$ ), la cytotoxicité des autres complexes de cuivre était inférieure à celle obtenue avec des concentrations équivalentes de  $\text{CuCl}_2$ . Ces observations, ouvrent de nouvelles perspectives pour l'utilisation de ces complexes de cuivre en tant qu'antioxydants et éventuellement en tant qu'agents thérapeutiques pour les maladies neurodégénératives. En outre, l'étude de ces complexes pourrait aider à améliorer le traitement des maladies induites par le débalancement de la concentration de cuivre.

De nouveaux films réticulés à base d'alcool polyvinylique (PVA) et de chitosane (Ch) ont été préparés en utilisant la technique de coulée en solution (de l'anglais : *polymer*

*solution casting*). Le film composite (PVA-Ch) a été réticulé chimiquement par du triméthaphosphate de sodium (STMP) et de la génipine (Gp). Le réticulant génipine, un composé d'origine naturelle, a été choisi en raison de sa toxicité inférieure à celle de nombreux autres réactifs de réticulation synthétiques couramment utilisés. Les films composites (PVA-Ch) ont été préparés selon trois approches différentes. Pour la première méthode (M1), le PVA a été réticulé séparément avec du STMP et mélangé avec du chitosane (Ch) non réticulé. Dans la méthode en deux étapes (M2), le PVA (réticulé par STMP) a été mélangé au chitosane (réticulé séparément avec la Gp). Dans la troisième méthode (M3), le PVA réticulé avec STMP et le chitosane (Ch) non réticulé ont été mélangés pour obtenir un agent homogène, puis la Gp a été ajoutée lentement. La stabilisation structurelle et chimique des films composites a été caractérisée par microscopie électronique à balayage (MEB), FTIR, analyse thermogravimétrique (TGA), calorimétrie à balayage différentiel (DSC) et DRX. Les propriétés mécaniques ont été testées (cassure, élongation) et la capacité d'absorption des fluides a été évaluée dans différents milieux. Les résultats obtenus par MEB et par TGA ont montré que la cristallinité du PVA-Ch diminuait après traitement avec des agents de réticulation. Les résultats de gonflement ont indiqué que les composites présentaient une sensibilité au pH dans des environnements acides. Avec l'augmentation de la teneur en chitosane dans le mélange, un gonflement croissant a été observé. Le composite a également montré une diminution de la vitesse de gonflement du composite avec la réticulation et avec l'augmentation de la teneur en génipine en tant que double agent de réticulation dans le composite PVA-Ch. De plus, les évaluations de cytotoxicité et de viabilité cellulaire ont été effectuées par des essais MTT avec des cellules P19 après 48 h. Les résultats de cytotoxicité des films ont clairement présenté une viabilité cellulaire adéquate. De plus, des études de libération de médicament à partir des films ont été effectuées en faisant varier le pH. Le complexe  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  a été incorporé en tant que médicament dans les films composites. Le relargage de médicament des films s'est révélé être affecté également par le procédé de réticulation et par le pH du milieu de diffusion. Les résultats préliminaires suggèrent

que ces nouveaux polymères réticulés à base de PVA-Ch ont un grand potentiel pour des médicaments à libération contrôlée et prolongée pour une administration ciblée.

Mots clés : Histidine, Sérine, Acides Aminés, Complexes de cuivre, Antioxydants, Stress Oxydatif, Cellules Neuronales Dérivées de P19, Alcool Polyvinylique, Chitosane, Film Composite, Agents de réticulation, Génipine, Trimétaphosphate de sodium (STMP), Livraison Transdermique

## ABSTRACT

Copper amino acid complexes synthesized decades ago and also known as «internal combinations», have received increasing attention in the past years, particularly for their potential biomedical application. One of the important copper chelators is the amino acid L-histidine (His). Copper bound with His represents an exchangeable pool of copper(II) with albumin in blood. Dysregulation of copper metabolism leads to various diseases. The transport properties of copper(II) histidine complex led to its application with success in the treatment of Menkes disease that was considered lethal in the first decade of life. However, injectable daily administration of this complex complicates its use and alternative routes of administration are desirable. Therefore, the isolation of copper(II)-histidine in solid state may be useful for an oral formulation and for transdermal administration in various copper-related disease.

The present doctoral project is proposed to open new windows on the utilization of copper complexes in biomedical and pharmaceutical applications, focusing on preparing a novel composite with polyvinyl alcohol and chitosan with different crosslinking agents as potential composite film for controlled drug delivery.

Copper coordinated with amino acid ligands is essential for the function of many proteins. Copper complexed to free L-Histidine, as  $[\text{Cu}(\text{His})_2]$ , is used in the treatment of the neurodegenerative Menkes disease and cardioencephalomyopathy. This study was aimed to coordinate copper(II) with four small ligands (L-Serine, L-Histidine, Urea and Biuret) and to evaluate stability, antioxidant activity and neuronal compatibility of the resulting complexes. These complexes were synthesized with

CuCl<sub>2</sub> and crystallized by precipitation in alcohol. Their structural features were characterized by elemental analysis, X-rays diffraction and FTIR. Stability was evaluated through UV-Vis absorbance profiles in water, physiological saline, gastric-like and intestinal-like solutions and by cyclic voltametry. The antioxidant capacity was measured using DPPH (1,1-diphenyl-2,2-picrylhydrazyl) and DPD (N,N-diethyl-p-phenylenediamine) methods, and neuronal compatibility was assessed through cell viability measurements using cultures of neurons derived from mouse P19 stem cells. The complexes were in the form of [Cu(ligand)<sub>2</sub>] and exhibited tridentate (L-Histidine), bidentate (L-Serine and Biuret) or monodentate (Urea) coordination with copper. All complexes and their ligands had antioxidant capacity, the [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] complex being the most potent. Contrarily to [Cu(Urea)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] and [Cu(Biuret)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], the [Cu(Ser)<sub>2</sub>] and [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] complexes were stable in different media including water, physiological saline and intestinal-like solutions. Although only [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] showed a good neurocompatibility (about 90 % at concentrations up to 200 μM), the cytotoxicity of the other copper complexes was lower (to equivalent concentrations of CuCl<sub>2</sub>). These findings open new perspectives for the use of [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] copper complexes as antioxidant and possibly as therapeutic agent for neurodegenerative diseases. Furthermore, study of these complexes may help to improve chelation therapy for copper dysfunctions.

Novel cross-linked polyvinyl alcohol (PVA) and chitosan (Ch) films were prepared using casting technique. The composite film (PVA-Ch) was chemically crosslinked by sodium tri-metaphosphate (STMP) and genipin (Gp). The crosslinker Genipin, a naturally derived compound, was selected because of its lower toxicity compared to many other commonly used synthetic crosslinking reagents. The composite films (PVA-Ch) were prepared by three different approaches. For first (M1) method, the polyvinyl alcohol (PVA) was cross-linked with STMP separately and was added to the non-crosslinked chitosan (Ch). In the method (M2), PVA cross-linked by STMP was added to chitosan (Ch) cross-linked with Gp. For the third method (M3), PVA cross-

linked with STMP separately was added to non-crosslinked chitosan and blended; then genipin (Gp) was added to the solution. The structural and chemical stabilization of the composite films were characterized through the scanning electron microscopy (SEM), FTIR, Thermogravimetric analysis (TGA), Differential Scanning Calorimetry (DSC), X-ray diffraction, mechanical properties and their swelling and disintegration behavior in different pH were investigated *in vitro* test. The results from SEM showed that the crystallinity of PVA-Ch decreased after treatment with crosslinkers.

By increasing the chitosan content relative to PVA, the swelling rate of composite has decreased. Also, by increasing the genipin content as a co-crosslinker in the PVA-Ch composite, the swelling rate significantly decreased, reflecting the mobility loss of the polymer network and hydrophilic behavior of film.

Moreover, cytotoxicity and cell viability tests were performed by MTT assays with cell P19 after 48 h. Cytotoxicity tests of the hydrogels have clearly presented adequate cell viability. Furthermore, drug release studies of the films were performed by varying the pH.  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  was loaded as drug in the composite films. The drug release from the films were found to be affected by method of crosslinking and the pH of the diffusion medium. The preliminary results suggest that these novel PVA-Ch crosslinked polymers may have a good potential for prolonged, controlled and targeted drug delivery.

Key words: Histidine, Serine, Amino acid copper complexes, Antioxidants, Electrolysis induced oxidative stress, Neuronal derivatives of P19 embryonic carcinoma cells, Polyvinyl alcohol, Chitosan, composite film, cross-linking agents, genipin, STMP, transdermal delivery

PARTIE I

INTRODUCTION

## PRÉAMBULE

Les complexes de métaux de transition avec les acides aminés sont utilisés dans de nombreux processus biologiques. Les ions métalliques sont impliqués dans un large éventail de fonctions biologiques dans le contexte intra et extracellulaire des systèmes vivants (O'Dell, 1976). Parmi les ions métalliques, le cuivre(II) joue un rôle essentiel dans tous les organismes vivants, par exemple en tant que composant de plusieurs enzymes (amine oxydase et superoxyde dismutase) (Bento *et al.*, 2007). La céruloplasmine est la principale protéine de transport du cuivre dans le sang. Elle lie plus de 95 % du cuivre total contenu dans le plasma humain (Flemming et Trevors, 1989). Alors que des traces de complexes de cuivre sont nécessaires sous des formes protéiques ou peptidiques pour les processus métaboliques normaux, le cuivre non lié peut être extrêmement toxique en excès en raison de sa capacité à générer des radicaux libres (Deschamps *et al.*, 2005). Les complexes d'acides aminés avec du cuivre ont fait l'objet de beaucoup d'attention et de nombreuses études ont été réalisées ces dernières années. L'histidine cuivre(II) présente dans le sang humain joue un rôle clé dans l'absorption de cuivre dans la cellule (Duchesne *et al.*, 2001). L'histidine possède un groupe fonctionnel imidazole qui peut coordiner le cuivre dans des métalloprotéines et fait également partie du site catalytique de certaines enzymes (Wang *et al.*, 1999).

Les propriétés de transport du complexe cuivre(II)-L-histidine ont conduit à son application dans le traitement de la maladie de Menkes (maladie neurodégénérative génétique fatale) caractérisée par une absorption insuffisante du cuivre(II) (Danks *et al.*, 1972; Sigel et McCormick, 1971). Récemment, il a été signalé que la cuivre(II)-L-histidine est probablement efficace dans le traitement de la cardioencéphalomyopathie hypertrophique infantile (Freisinger *et al.*, 2004). La L-sérine (Ser) est un acide aminé

non essentiel qui peut être synthétisé par de nombreuses cellules, à l'exception de certains types, telles que les sous-populations de cellules gliales et neuronales qui dépendent de l'absorption de Ser pour soutenir leur survie et leur développement (Pecul, 2006). Le cuivre complexé avec Ser pourrait être capturé par des cellules via des transporteurs de Ser dans des situations de transporteurs de cuivre régulés négativement. L'urée est un produit endogène du catabolisme des protéines et des acides aminés et est présente à différentes concentrations dans le sang et divers organes (Duchesne *et al.*, 2001). Dans des conditions physiologiques, il a été montré que l'urée agissait en tant qu'antioxydant et en tant qu'agent cardioprotecteur (Wang *et al.*, 1999). Le biuret est souvent utilisé avec l'urée dans l'alimentation animale comme excellent additif azoté non protéique, offrant une meilleure palatabilité par rapport à l'urée (Currier *et al.*, 2004). Il contient deux groupes acylamine et un groupe imine, une structure compatible avec son utilisation en tant que ligand neutre dans divers complexes, principalement pour des études structurales ou des applications bioanalytiques (le dosage de protéines par biuret).

La durée de vie des êtres humains augmente, mais avec l'augmentation de la sénescence, il existe également un risque de maladies métaboliques et neurologiques. Une des principales raisons de ces dysfonctionnements est le dommage oxydatif. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) induisent des lésions oxydatives des biomolécules et des organites, puis entraînent diverses maladies telles que Parkinson, Alzheimer, des dysfonctionnements cardiaques et même des cancers (Guidi *et al.*, 2006). L'organisme a ses propres mécanismes de défense, mais souvent ils sont altérés ou simplement ces mécanismes ne sont pas assez puissants pour assurer la protection (Sas *et al.*, 2007). C'est pourquoi les nouveaux agents antioxydants et protecteurs suscitent un vif intérêt. Le corps humain contient environ 100 à 150 mg de cuivre et la dose quotidienne recommandée est de 1 à 3 mg (Adelstein et Vallee, 1961). Le syndrome de Menkes est une maladie génétique héréditaire due à un gène non typique (ATP7A), induisant une absorption réduite du cuivre. Les malades Menkes ont un taux

de cuivre anormalement bas dans le cerveau et le foie et un excès de cuivre dans les intestins et les reins (Kumar et Low, 2004).

Cette maladie fatale provoque la mort dans la première décennie de la vie du patient. Il n'y avait pas de remède pour le syndrome de Menkes. Un traitement précoce avec des injections d'histidine de cuivre peut apporter un bénéfice temporaire [Deschamps *et al.*, 2005]. Cependant, son administration par voie intraveineuse limite son utilisation et d'autres voies d'administration sont toujours nécessaires. Les recherches sur le cuivre et la fonction cérébrale doivent encore être approfondies, mais des recherches préliminaires ont montré que la thérapie à cuivre pouvait avoir des résultats positifs en diverses maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (Klevay, 2008). Des complexes du cuivre possèdent des propriétés anti-inflammatoires qui aident à réduire les symptômes (douleur et raideur) de la polyarthrite rhumatoïde (Sorenson et Hangarter, 1977). Par conséquent, l'isolement du complexe de cuivre(II) à l'état solide peut être utile pour une administration transdermique dans diverses maladies liées au cuivre.

Les systèmes d'administration transdermique de médicaments sont définis comme des dispositifs sous forme de timbres permettant d'administrer des médicaments. Les membranes polymériques (naturelles et synthétiques) sont couramment utilisées dans ces systèmes, en raison de leurs propriétés filmogènes. L'objectif du projet était de produire des complexes de cuivre et à les incorporer dans des timbres transdermiques (afin de mettre au point un traitement de la maladie de Menkes ou d'autres maladies liées à une carence en cuivre).

Les hydrogels ont fait l'objet d'une attention considérable au cours des dernières décennies, principalement en raison de leur mollesse, non-toxicité et biocompatibilité (Hamidi *et al.*, 2008). La principale limite d'utilisation des hydrogels est liée à leurs propriétés mécaniques médiocres. Pour améliorer cet inconvénient, les hydrogels peuvent être modifiés par mélange physique (Chuang *et al.*, 1999), par de réticulation

chimique / physique ou par interpénétration de réseaux de polymères (Dimida *et al.*, 2015; Peniche *et al.*, 1999). Nous avons choisi deux types de polymères : le chitosane (naturel) et l'alcool polyvinylique (PVA, synthétique).

Le chitosane est un polysaccharide naturel composé de résidus de  $\beta$ -(1,4)N-acétylglucosamine et de glucosamine répartis de manière aléatoire (Muzzarelli, 2010; Rinaudo, 2006). Le chitosane est, biodégradable, biocompatible, polycationique et non toxique. Ces propriétés en font un élément idéal dans un large éventail d'applications dans les systèmes de séparation biochimiques dans les domaines médical, pharmaceutique, chimique, agricole, le génie tissulaire, les biomatériaux et les systèmes à libération contrôlée de médicaments (Kim *et al.*, 2008; Koppolu *et al.*, 2014; Kweon *et al.*, 2003). La nature hydrophile du chitosane exige certaines modifications chimiques avant d'être utilisé comme matrice de libération de médicaments. Une modification possible est la réticulation (Mi *et al.*, 2006). Des agents de réticulation et des plastifiants sont ajoutés aux films polymériques pour améliorer les propriétés texturales en les rendant plus résistants (Zhang *et al.*, 2010). Les hydrogels de chitosane peuvent être préparés par réticulation physique ou chimique de chaînes polymères. Des polymères synthétiques tels que le PVA sont mélangés à des polymères naturels, tels que le chitosane, afin d'améliorer leurs propriétés mécaniques médiocres (Tanigami *et al.*, 1995). Le PVA est un polymère synthétique hydrosoluble largement utilisé dans des applications pharmaceutiques et les biomatériaux (Chan *et al.*, 1999). En raison de sa bonne stabilité chimique, hydrophilicité, non-toxicité, biodégradabilité, biocompatibilité, de sa bioadhésivité et de sa non cancérogénicité, le PVA est un bon candidat pour des applications biomédicales (Abraham *et al.*, 2016). De plus, le PVA possède d'excellentes propriétés physiques et mécaniques et une bonne tendance filmogène en raison de l'abondance de groupes hydroxyle (Lee *et al.*, 1996). Par conséquent, la combinaison de ces deux polymères (PVA et chitosane) peut contribuer à améliorer les propriétés mécaniques du nouveau composite.

## CHAPITRE I

### LES COMPLEXES DE CUIVRE

#### 1.1 La chimie du cuivre

La recherche en chimie du cuivre et en synthèse de médicaments est dominée par les composés utilisant les états d'oxydation les plus courants (Santini *et al.*, 2014). Le cuivre possède trois états d'oxydation : Cu(I), Cu(II), Cu(III) et forme essentiellement deux types de composés : les composés cuivreux Cu(I) et cuivriques Cu(II). Les ions Cu(I) ont une configuration  $d^{10}$  et peuvent former des complexes avec des ligands présentant des caractéristiques de donneurs « mous », tels que ceux contenant des groupes thioéther S et des groupes azotés aromatiques (Marzano *et al.*, 2009). Ces complexes ont tendance à présenter une géométrie linéaire, trigonale ou tétraédrique (Rorabacher, 2004; Tisato *et al.*, 2010). Les ions Cu(II) ont une configuration  $d^9$  et des complexes avec une géométrie de coordination favorisent des géométries de 4 à 6 coordonnées (plan-carré, bipyramidal trigonal et octaédrique) et permettent une grande variété de ligands de différentes denticités et tailles. Les ligands de Cu(II) sont favorisés vis-à-vis des donneurs N, O, S (Iakovidis *et al.*, 2011).

La stabilité des complexes de métaux divalents peut être prédite dans une certaine mesure en utilisant la série d'Irving-Williams (page 17). Ainsi, Cu(II) est un bon choix de métal car les complexes seraient plus stables par rapport à d'autres espèces de métaux potentiels. La capacité du cuivre à assumer deux états d'oxydation, oxydé ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ou réduit ( $\text{Cu}^+$ ), fournit le pouvoir redox permettant de conduire des réactions enzymatiques et coordiner avec des ensembles distincts préférés de ligands d'acides

aminés pour une variété de structures de protéines. Pour exemple,  $\text{Cu}^+$  préfère les ligands riches en thiol et le  $\text{Cu}^{2+}$  est souvent associé à des ligands de l'azote ou de l'oxygène (Davis et O'Halloran, 2008).

Bien que les ions de cuivre soient essentiels à la croissance et au développement normal des mammifères, il est probable que l'excès de Cu s'engage dans une chimie redox qui génère des radicaux libres dommageables tels que des radicaux hydroxyles (Halliwell et Gutteridge, 1990). Ces revues sont exhaustives et mettent en évidence les possibilités thérapeutiques offertes par les complexes de cuivre en ce qui concerne l'hétérogénéité des ligands et la diversité des applications thérapeutiques.

#### L'homéostasie du cuivre dans les systèmes vivants

Les enzymes à cuivre utilisent le métal comme donneur/accepteur d'électrons grâce aux deux états redox  $\text{Cu(I)}$  et  $\text{Cu(II)}$ . Cependant, les propriétés d'oxydoréduction du cuivre peuvent également provoquer des dommages au sein de la cellule. C'est pourquoi l'homéostasie du cuivre est devenue une nécessité dans l'évolution du métabolisme aérobie. En conditions anaérobies, le cuivre passe de l'état  $\text{Cu(I)}$  à l'état  $\text{Cu(II)}$  (Verwilt *et al.*, 2015). Les systèmes de prise en charge du cuivre doivent d'abord être spécifiques pour assurer la régulation de la concentration du cuivre en présence d'autres cations comme le nickel ou le zinc.

D'autre part, comme chez la levure où tous les ions cuivre sont pris en charge par des chélateurs couplés à des systèmes d'efflux (Rae *et al.*, 1999), des bactéries doivent prendre en charge différents groupes de coordination (Festa et Thiele, 2011). On sait que  $\text{Cu(I)}$  se lie aux groupes thiol des protéines permettant la capture et le transport du cuivre. En effet, les ions libres deviennent toxiques dans la cellule en créant des radicaux libres (par exemple des radicaux hydroxyles au cours de réactions de type Fenton (pages 36).

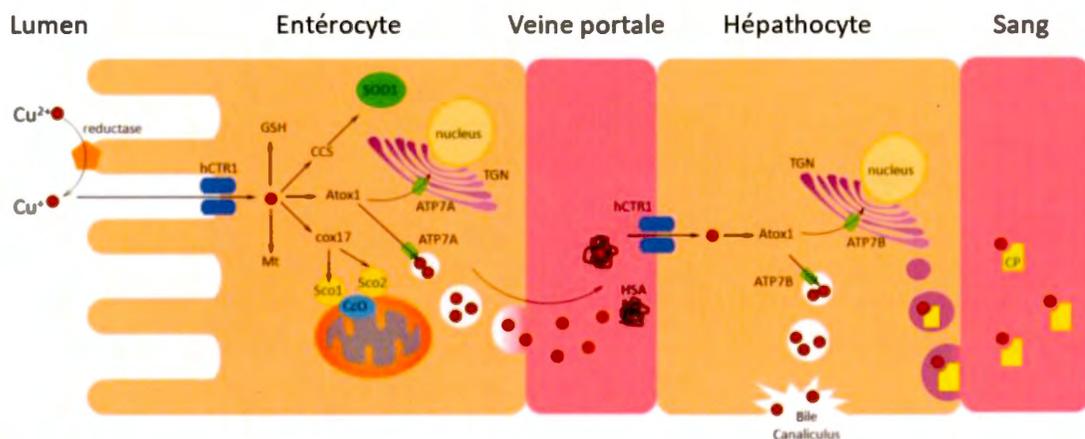
#### Les composantes cellulaires pour la régulation du cuivre

Il est connu que Cu(II) est un cofacteur pour les métalloenzymes, notamment la superoxyde dismutase (EC 1.15.1.1), la cytochrome c oxydase (EC 1.9.3.1), la tyrosinase (EC 1.14.18.1), la peptidylglycine alpha-amidante monooxygénase (1.14.17.3) et la lysyl oxydase (EC 1.4.3.13), ceruloplasmine, hemocyanine (Balamurugan et Schaffner, 2006; Grass *et al.*, 2011). Les états d'oxydation du cuivre permettent d'interagir avec diverses protéines qui entraînent une multitude de réactions biochimiques. Compte tenu de ses nombreux rôles biologiques, les niveaux de Cu(II) sont étroitement régulés à tous les niveaux, y compris l'absorption, la distribution, la détoxification et l'élimination cellulaire (Balamurugan et Schaffner, 2006; Pena *et al.*, 1999). Ces mécanismes sont essentiels pour maintenir l'homéostasie du cuivre et éviter les toxicités associées.

Le cuivre est absorbé par l'organisme au niveau de l'intestin grêle. Existant principalement à l'état redox  $\text{Cu}^{2+}$  dans l'espace extracellulaire (Fig. 1.1), il est réduit en  $\text{Cu}^+$  par des réductases sur la surface de la cellule et est ensuite transporté à travers la membrane cellulaire par le transporteur humain de cuivre 1 (hCTR1), un transporteur de haute affinité (Balamurugan et Schaffner, 2006; Gupta et Lutsenko, 2009; Sharp, 2003). De plus, des chaperons de cuivre (CC) sont présents pour délivrer le Cu importé à des protéines spécifiques dans la cellule (Harrison *et al.*, 2000) et maintiennent le cuivre dans un état lié pour prévenir le cycle redox. Les CC livrent les ions du cuivre à leurs cibles intracellulaires.

Le hCTR1 est le transporteur de cuivre principalement responsable de l'apport de Cu dans la cellule. ATOX1 est gène code pour un chaperon en cuivre. Chez les mammifères, ATOX1 joue un rôle clé dans l'homéostasie du cuivre car elle fournit du cuivre du cytosol aux transporteurs ATP7A et ATP7B (Klomp, 1997). Par exemple, ATOX1 est requis pour que le cuivre soit livré à une ATPase de transport, ATP7A, exprimée dans le réseau trans-Golgi (TGN), où le cuivre est inséré dans une variété de protéines. Le rôle de l'ATP7B, montré dans l'intestin grêle, est encore mal compris.

Dans les situations d'exposition forte au cuivre, hCTR1 est endocyté, la métallothionéine est induite et ATP7A se déplace vers une autre localisation. En conséquence, les entérocytes de l'intestin grêle libèrent du cuivre au site apical vers le sang (Gupta et Lutsenko, 2009; Sharp, 2003). De nouveau, afin d'éliminer les dommages oxydatifs, les ions Cu libres dans le sang sont liés par l'albumine sérique, mais surtout par la CP (Bento *et al.*, 2007), pour ensuite être transportés au foie. Ensuite, les ions Cu sont à nouveau transportés à travers la membrane cellulaire par hCTR1 et dans ce cas, Atox1 fournit les cations à l'ATP7B. Lors de la livraison à ATP7B dans le réseau trans-Golgi, le Cu est inséré dans la CP (la ferroxidase) est libérée dans le flux sanguin (Harris et Gitlin, 1996; Verwilst *et al.*, 2015).



**Figure 1.1 Régulation cellulaire des niveaux de cuivre.** Le cuivre, existant principalement à l'état redox  $\text{Cu}^{2+}$  dans l'espace extracellulaire, est réduit par les réductases sur la surface de la cellule et est ensuite transporté à travers la membrane cellulaire par hCTR1. D'après (Verwilst *et al.*, 2015).

### 1.1.1 Les ions de cuivre en physiopathologie

Les besoins alimentaires en cuivre ne sont que de 0.7 à 0.9 mg/jour et pourtant, il est essentiel à la croissance et au développement de tous les organismes aérobie (Festa et Thiele, 2011; Fraga, 2005). La dérégulation de l'homéostasie du  $\text{Cu(II)}$  a permis de

mieux comprendre son importance dans la physiologie humaine (Menkes, 1999). Par exemple, les mutations génétiques dans ATP7A, qui code pour une ATPase transportant le Cu, conduisent à la production d'une enzyme dysfonctionnelle tronquée, entraînant une faible distribution du Cu, ce qui est lié à une maladie mortelle appelée syndrome de Menkes. Puisque l'ATP7A est responsable du transfert et de la libération du Cu en tant que cofacteur et régulateur de certaines enzymes ainsi que de l'efflux de Cu des cellules, la perte de la fonction ATP7A entraîne une accumulation de Cu dans certains tissus, tels que l'intestin grêle. D'autre part une déficience systémique en Cu conduit à une neurodégénérescence et à des anomalies de croissance (Daniel *et al.*, 2004; Kaler, 2013; Kaler, 1998).

La maladie de Menkes se caractérise par des cheveux crépus, fragiles et incolores, une peau hypopigmentée et lâche, des retards mentaux ou de croissance, la neurodégénérescence et la mort avant trois ans (Danks *et al.*, 1972). La maladie est diagnostiquée chez 1 personne sur 298 000 à 357 000 bébés nés et affecte principalement les garçons. Les symptômes les plus graves de la maladie correspondent à l'incapacité à absorber les ions  $\text{Cu}^{2+}$  de la circulation sanguine. Lorsqu'elle est diagnostiquée tôt, la supplémentation du Cu sous forme d'un complexe cuivre-histidine peut limiter les symptômes neurologiques de la maladie (Bento *et al.*, 2007). Cependant, le résultat du traitement dépend en grande partie de l'activité résiduelle de ATP7A mutante et du moment du traitement initial (Kim *et al.*, 2003; Kodama *et al.*, 2012). L'injection parentérale de cuivre, rapportée en 1993, est la plus efficace thérapie (Deschamps *et al.*, 2005). Son efficacité dépend de l'âge de la première administration et du type de mutation du gène (Gala *et al.*, 2014). En revanche, la maladie de Wilson est une maladie provoquée par des mutations de l'ATP7B, principalement exprimées dans le foie et le cerveau. Le dysfonctionnement de l'ATP7B entraîne une altération de l'excrétion de l'excès de Cu du corps et une accumulation prolongée, induisant des lésions tissulaires, en particulier du foie, du cerveau, des reins et de la cornée (Telianidis *et al.*, 2013). Le cuivre est donc retenu dans les hépatocytes. Étant donné

que les plus grandes quantités de céruloplasmine (CP) sont produites par les hépatocytes, de nombreux patients présentent des taux de Cp dans le sang extrêmement faibles, car l'apo-Cp (dépourvu de cuivre) se dégrade rapidement (Deschamps *et al.*, 2005). En raison des effets toxiques du cycle redox des ions Cu libres dans le foie chez les patients atteints de la maladie de Wilson, une cirrhose est fréquemment observée, fatale et sans traitement. La maladie de Wilson est généralement traitée par chélation avec des agents tels que la pénicillamine et la trientine (Kaler, 2013). Les symptômes neurologiques causés par l'excès d'absorption de Cu dans le cerveau se manifestent par la maladie de Parkinson sous forme de tremblements, manque de coordination et convulsions (Waggoner *et al.*, 1999).

## 1.2 Le cuivre dans les molécules bio-organiques

Les protéines à Cu sont impliquées dans divers processus biologiques et une déficience de ces enzymes ou une altération de leur activité provoque souvent des états pathologiques ou des conditions physiopathologiques (Puig et Thiele, 2002).

Une protéine qui contient un ou plusieurs ions métalliques étroitement liés aux chaînes latérales d'acides aminés est appelée une métalloprotéine. Une métalloprotéine qui catalyse une réaction chimique est une métalloenzyme (**Tableau. 1.1**). Les peptides peuvent lier efficacement et spécifiquement certains ions métalliques. De plus, la possibilité d'avoir différents sites de liaison des métaux dans la séquence des peptides permet d'obtenir des complexes avec une grande variété de conformations en modifiant les contraintes énergétiques et stériques. La compréhension des éventuelles fonctions biologiques dépend de l'interaction entre les résidus de liaison du ligand et les ions métalliques. Les mécanismes moléculaires impliquent la liaison des ions métalliques avec des résidus spécifiques dans les protéines (Feriden, 1976; Festa et Thiele, 2011).

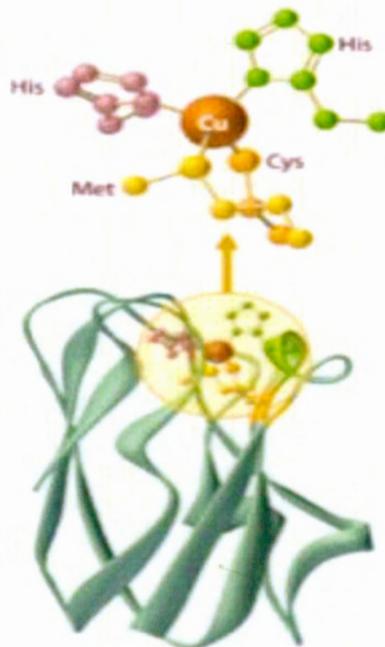
**Tableau 1.1 Enzymes reconnues dépendantes du cuivre et leur fonctions biochimiques**

<b>Enzyme dépendante du Cu</b>	<b>Fonction</b>
Céruloplasmine	Accumulation et conservation de la réserve de fer, ferroxidase, transport du cuivre, mimétique de l'activité de la SOD.
Superoxyde dismutase (Cu / Zn-SOD)	Catalyse la dismutation du superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène. Il joue le rôle le plus important dans la protection antioxydante de presque toutes les cellules qui sont en contact avec l'oxygène dans n'importe quelle mesure.
Cytochrome c oxydase	Agent réducteur d'oxygène.
Tyrosinase (catéchol oxydase)	Formation de mélanine.
Diamine oxydase	Inactivation de l'histamine et des polyamines (cellulaire et extracellulaire).
Amine oxydase (extracellulaire)	Inactivation de l'histamine, de la tyramine, de la dopamine, sérotonine
Peptidylglycine monooxygénase	Bioactivation des hormones peptidiques.

Dans les maladies associées au polymorphisme des nucléotides (les dSNP, *disease-related single nucleotide polymorphism*), le rôle des ions métalliques est directement lié à la maladie humaine et l'identification des résidus de liaison aux ions métalliques revêt une grande importance pour le développement de médicaments moléculaires destinés à leur traitement. Le complexe glycine-L-histidine-L-lysine cuivre (GHK-Cu) est le complexe tripeptide-métal naturel le plus connu pour son activité anti-vieillesse.

La céruloplasmine (CP) est une chaîne polypeptidique unique ayant une masse molaire d'environ 132 kDa et contient sept ions Cu(II). La CP transporte plus de 80 % du Cu total qui circule dans le sérum et constitue un lien majeur entre le métabolisme du cuivre et du fer (Harris et Gitlin, 1996). Le centre du Cu dans les protéines de cuivre

bleu a une structure tétraédrique déformée, dans laquelle le cuivre est lié à quatre chaînes latérales d'acides aminés (**Fig. 1.2**).



**Figure 1.2 Coordination du cuivre dans la céruloplasmine.** Dans les formes oxydées et réduites d'une protéine de cuivre bleue (CP), le cuivre est coordonné par quatre ligands dans un arrangement approximativement tétraédrique. D'après (Bento *et al.*, 2007).

En plus de son rôle potentiel dans la libération du cuivre aux cellules et dans l'excrétion du Cu corporel, cette glycoprotéine est une ferroxidase et catalyse la conversion du fer ferreux en fer ferrique qui est ensuite transféré à la transferrine (porteur plasmatique du  $\text{Fe}^{3+}$ ). Cela permet d'amener le fer de l'extérieur des cellules pour un transport ultérieur de la moelle osseuse aux globules rouges, où réside la majorité du fer (David et Patel, 2000). En cas de carence sévère en cuivre, il y a peu ou pas de CP contenant du cuivre dans le plasma et les tissus, ce qui entraîne une accumulation de fer dans le foie (Frieden et Hsieh, 1976; Tapiero *et al.*, 2003). Les niveaux de CP immunitaire

mesurés de manière enzymatique et ils sont utilisés pour évaluer le stockage de Cu dans le corps, car il agit comme une protéine réactive aigüe dans les situations de stress et de traumatisme (Bento *et al.*, 2007).

### 1.2.1 La cytochrome c oxydase

La cytochrome c oxydase (CCO) est liée à la membrane mitochondriale interne. C'est une enzyme qui fait partie de la chaîne respiratoire mitochondriale et qui participe donc à la production d'énergie. Elle possède deux hèmes, un cytochrome a et un cytochrome a<sub>3</sub>, et deux centres de cuivre (Liu *et al.*, 2014). C'est l'oxydase terminale dans la plupart des organismes aérobies et elle réduit l'oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>) en eau. En plus de la réduction de l'O<sub>2</sub>, la cytochrome c oxydase pompe les protons de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane (Tapiero *et al.*, 2003). Des études ont montré que les activités de la CCO étaient réduites en raison de l'épuisement du cuivre dans certaines maladies (Alzheimer).

Les métallothionéines (MTs), de faible masse moléculaire et riches en cystéine, sont des protéines de liaison aux métaux. Elles présentent au moins deux isoformes codées par plusieurs gènes (Vasak, 2005). Les fonctions biologiques des MTs sont : détoxification des tissus contaminés par des ions métalliques, y compris des ions non essentiels et en excès, stockage des micro-éléments essentiels et capture des dérivés réactifs oxygénés (en anglais : *reactive oxygen species, ROS*) et azotés. Les MTs se lient aux ions Zn, Cu et Cd. Le cuivre se lie plus fortement, peut déplacer d'autres ions et peut même être réduit en forme inactive Cu<sup>+</sup>. Les MTs sont induites (dans des conditions déficientes en Cu) pour maintenir l'activité des proenzymes à Cu intracellulaires telles que la CCO et pour piéger les ROS au lieu des antioxydants contenant du cuivre, tels que Cu / Zn-SOD (Coyle *et al.*, 2002).

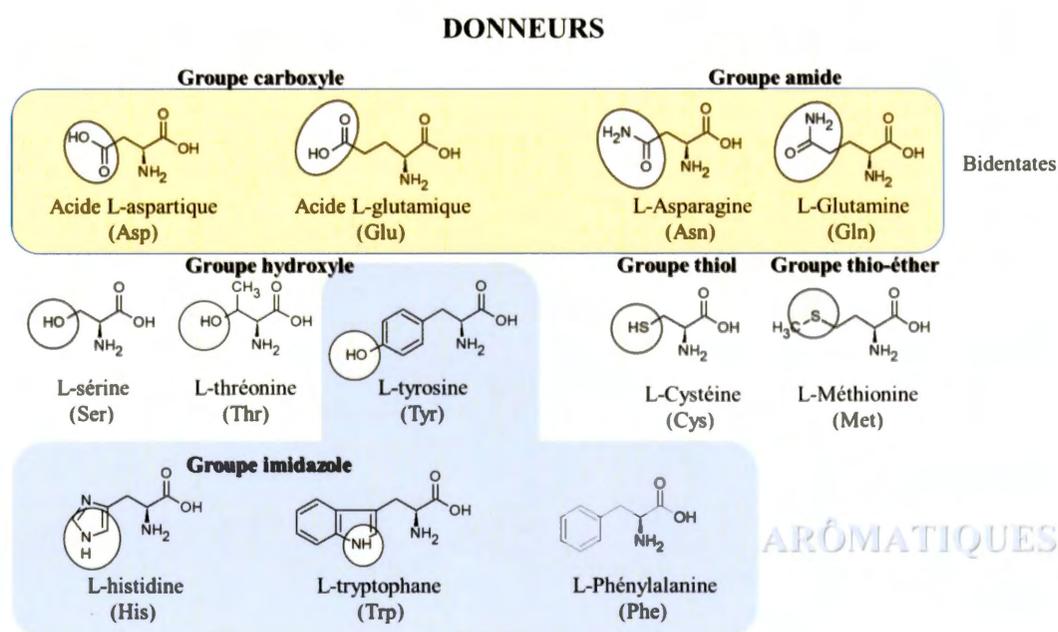
### 1.3 Les complexes de cuivre avec des acides aminés

Les fonctions d'une protéine sont déterminées à partir de ses acides aminés et dépendent de l'interaction avec les cofacteurs, de la liaison avec les ions métalliques et de l'interaction avec d'autres protéines (Akram *et al.*, 2011). Les complexes de métal-acide aminé ont fait l'objet de nombreuses recherches expérimentales et théoriques au cours des dernières décennies en raison de leur capacité à imiter les sites actifs de divers systèmes bio-macromoléculaires. Ils sont donc apparus comme une approche fiable pour gagner de connaissance approfondie des propriétés structurales et fonctionnelles des métalloprotéines et des métalloenzymes. De telles investigations sont plus simples et moins coûteuses que celles des macromolécules natives et permettent d'approfondir la compréhension de la nature fondamentale des interactions des ions métalliques avec les acides aminés ainsi que de leurs dérivés.

Assembler et exploiter les informations pertinentes concernant les interactions métal-acide aminé devient également une nécessité de l'heure dans le domaine de la conception rationnelle des métalloprotéines (DeGrado *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2001) et de l'élargissement du spectre des propriétés des métalloprotéines conçues ou *de novo* (Lu, 2005; Xie *et al.*, 2007). Le protéome de tous les organismes partage des ions métalliques et des cofacteurs de liaison des métaux pour remplir les fonctions essentielles. Il a été estimé qu'environ 30 % de toutes les protéines contiennent au moins un métal. Les nombreux ions métalliques qui se lient aux protéines sont respectivement les ions cuivre, fer, magnésium, manganèse et zinc. La série d'Irving-Williams montre la tendance de l'affinité des différents ions métalliques pour la plupart des environnements protéiques (Dupont *et al.*, 2010).

Les ions métalliques sont généralement coordonnés par les centres azotés, oxygénés ou soufrés des acides aminés. Ces centres peuvent être fournis par des groupes amine et carboxyle de la chaîne principale mais dans les protéines, la liaison du métal est réalisée par les chaînes latérales d'acides aminés. En particulier, les groupes carboxylates de

l'acide aspartique et de l'acide glutamique; les groupes hydroxyle de la sérine, de la thréonine, de la tyrosine; le groupe imidazole de l'histidine et du tryptophane permettent de lier des métaux en tant que groupes donneurs (Wilson *et al.*, 1970). Les autres chaînes latérales qui lient les ions métalliques comprennent les groupes carboxyle (moins souvent les groupes amine) de l'asparagine et de la glutamine; les groupes thiol de la cystéine et thioéther de la méthionine (**Fig. 1.3**).



**Figure 1.3**                      **Coordination sur des fonctions des chaînes latérales des acides aminés.**

Les acides aminés aromatiques sont la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane et l'histidine (Akram *et al.*, 2011). Ils ont une stabilité supplémentaire en raison de la disposition des électrons  $\pi$  situés au-dessus et au-dessous du plan du cycle aromatique (Bukharov *et al.*, 2014). Les interactions qui se produisent entre les chaînes latérales des résidus d'acides aminés aromatiques sont désignées sous le nom d'interactions aromatiques-aromatiques  $\pi$ - $\pi$ . Les interactions cation- $\pi$  entre les acides aminés protonés ( $\text{Arg}^+$ ,  $\text{Lys}^+$  et  $\text{His}^+$ ) et les acides aminés aromatiques (Phe, Tyr, Trp et His)

sont 2.5 à 5 fois plus fortes que les liaisons hydrogène classiques et sont moins affectés par le solvant et le pH que les interactions l'électrostatique (Shimazaki *et al.*, 2009). Les complexes de cuivre avec des composés aromatiques hétérocycliques ont fait l'objet de nombreuses études en raison de leur diversité et propriétés physiques et chimiques. En combinaison avec différents ligands biologiques, ils ont des applications potentielles en biomédecine, industrie, protection de l'environnement et science des matériaux (Bukharov *et al.*, 2014).

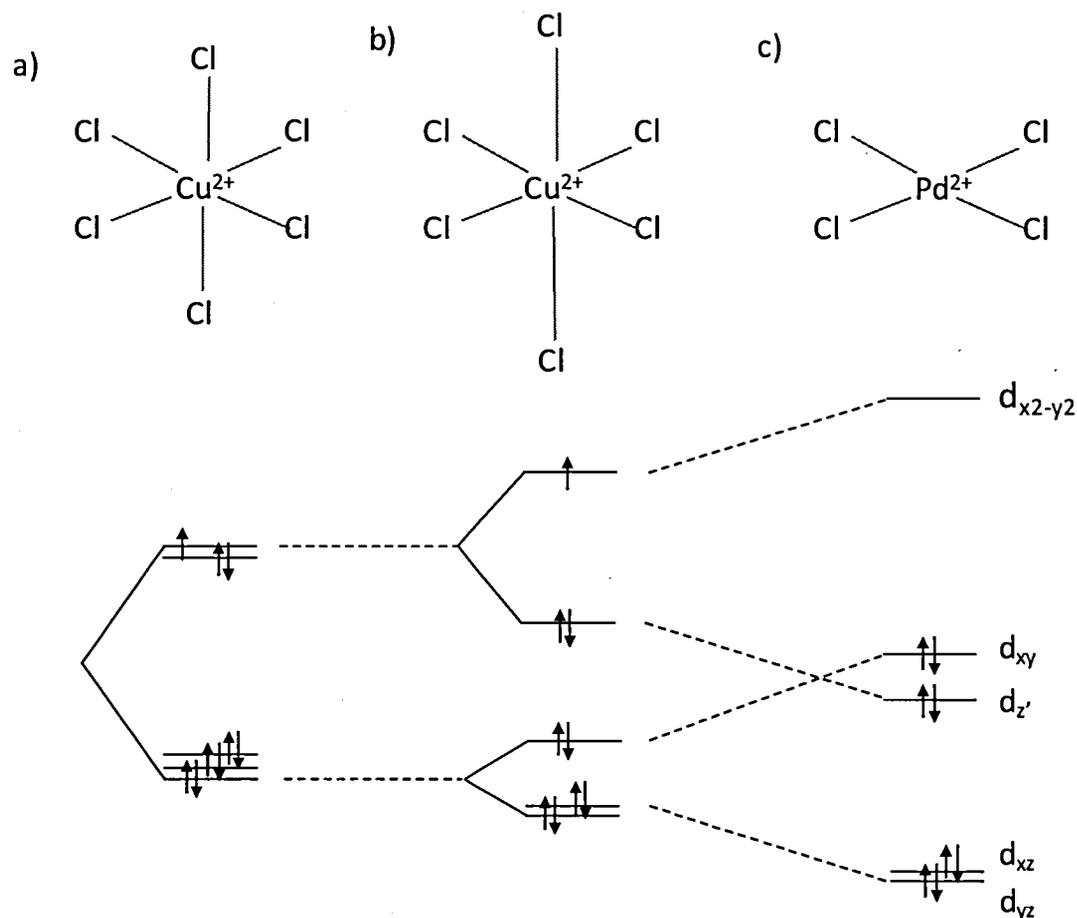
Les complexes de métaux de transition avec des acides aminés dans des protéines et des peptides sont utilisés dans de nombreux processus biologiques, tels que le transport d'oxygène, le transfert d'électrons et l'oxydation. Une étude a établi que les ions métalliques coordonnés au cycle imidazole de l'histidine peuvent être impliqués dans l'empilement du cycle avec la chaîne latérale aromatique de certains acides aminés (Laurie, 1995). Les interactions de coordination entre les cations histidine et les ions métalliques sont les plus fortes, suivies des interactions cation- $\pi$ , hydrogène- $\pi$  et  $\pi$ - $\pi$  (Shimazaki *et al.*, 2009).

Les complexes de cuivre(II) d'acides aminés et de peptides contenant les résidus chélateurs de bis(imidazolyle) ont été grandement passés en revue dans la littérature (Prenesti et Berto, 2002). Les résultats révèlent que les analogues bis-imidazolyle sont des ligands très efficaces pour la liaison des métaux. Les atomes d'azote (donneurs d'électrons) de l'agent chélatant sont les principaux sites de liaison des métaux dans des conditions acides. Un grand nombre d'études réalisées sur des complexes de cuivre avec des acides aminés ont montré que la présence d'histidine dans les peptides améliore de manière significative la capacité de liaison des ligands au métal, dépendamment de la localisation des résidus histidyle dans la chaîne peptidique (Prenesti et Berto, 2002; Sarkar, 1999).

### 1.3.1 Généralités sur les complexes à cuivre

Dans un complexe, les interactions ne sont pas nécessairement covalentes comme il est souvent question en chimie organique. Un lien covalent est une liaison où chaque atome retient un électron mais un lien de coordination est une liaison dite « dative » où une paire d'électron partagée provient d'un seul atome (Wulfsberg, 2002). La théorie du champ cristallin permet d'organiser dans l'espace l'orientation des ligands. Pour cela, chaque ligand est considéré comme une charge ponctuelle. Idéalement, les électrons s'organisent autour de l'atome pour avoir des énergies équivalentes, or ce n'est pas le cas; certains peuvent être appariés, d'autres seuls et des orbitales peuvent être vides. Comme l'interaction avec un ligand peut être liante, non-liante ou antiliante, elle pourrait dépendre de l'organisation et l'orientation des orbitales. La façon dont le ligand approche le métal peut aussi avoir un impact sur le type d'interaction. La plupart du temps, les orbitales sont inégalement peuplées et le champ cristallin des métaux du bloc d adoptera une symétrie octaèdre déformé (Fig. 1.4). Dans ce type de symétrie, certaines interactions sont plus répulsives et les longueurs des liaisons métal-ligand seront variables.

Dans un complexe idéal, les ligands sont tous à la même distance (a). La densité électronique autour du cuivre n'est pas homogène par la présence des électrons d, ce qui dégénère les niveaux énergétiques et donne lieu à la géométrie octaédrique déformée, où les ligands axiaux sont plus distants. Comme le cuivre est à champ faible, il préfère avoir des ligands moins fortement liés que de paier ses électrons (b). Dans un complexe d8 à champ fort comme pour le palladium, les électrons du cuivre préfèrent se paier, donnant des orbitales antiliantes; les ligands axiaux ont disparu (c). Reproduit selon (Wulfsberg, 2002).



**Figure 1.4** L'effet Jahn-Teller sur l'organisation des ligands dans des complexes. D'après (Wulfsberg, 2002).

Le Cu, de nombre atomique 29, possède 11 électrons externes qui s'organisent en  $3d^{10} 4s^1$ . L'électron seul peut être donné pour former l'état d'oxydation  $Cu^+$  qui est stable. La théorie du champ cristallin utilise l'hypothèse que les ligands sont comme des charges ponctuelles. Lorsque les électrons du métal sont en présence d'un ligand, ils ont le choix de s'apparier avec un autre électron ou de participer à la liaison. Lorsque l'énergie requise pour former une paire d'électrons est supérieure à l'énergie de liaison, l'électron s'engagera plutôt dans la coordination avec le ligand. Les complexes qui ont tendance à former des paires d'électrons sont dits à champ élevé.

Selon l'énergie d'appariement de l'ion métallique et le caractère du ligand, il est possible de prédire le type de complexe formé. Les types de liaisons aussi vont influencer l'énergie des orbitales si c'est une liaison sigma ou pi, liante ou anti-liante.

Il peut être difficile de prévoir l'impact d'un champ faible ou fort sur l'environnement d'un complexe, par contre, l'appariement des électrons a un impact sur le rayon de l'atome (Fig. 1.5). Ainsi, à champ fort, les atomes ont un rayon plus petit qu'à champ faible. Aussi, l'état d'oxydation a un impact sur le rayon : *i.e.* Cu(II) est plus gros que Cu(III).

Cela a une importance capitale au niveau biologique car certains composés comme les porphirines peuvent chélater de façon très spécifique certains ions selon la structure du cycle et le rayon de l'ion. Cela s'observe avec le Mg de la chlorophylle et le Fe de l'hème.

Ces aspects expliquent aussi pourquoi les quatre premiers métaux de transition (Scandium, Titanium, Vanadium, Chromium) sont peu observés dans des complexes dans la nature. Les éléments du début de la série d se comportent comme des acides forts et se coordinent mal avec les azotes donneurs qui sont ni des donneurs « durs », ni des donneurs « mous » mais qui sont dits des bases « frontières ». Les métaux de la fin du bloc d se comportent comme des acides « mous », c'est-à-dire qu'ils sont gros, polarisables et que leur orbitale inoccupée de plus basse énergie (de l'anglais LUMO : *lowest unoccupied molecular orbital*) est moins énergétique que celle des acides durs. Chargés 2+, ils forment des complexes stables avec des ligands à champ faible. La stabilité des complexes suit presque l'ordre du tableau périodique :  $Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} > Zn^{2+}$  et cette série est nommée Irving-Williams. Elle s'applique bien à l'étude des métalloenzymes mais pas aux macrocycles à cause de leur sélectivité stérique.

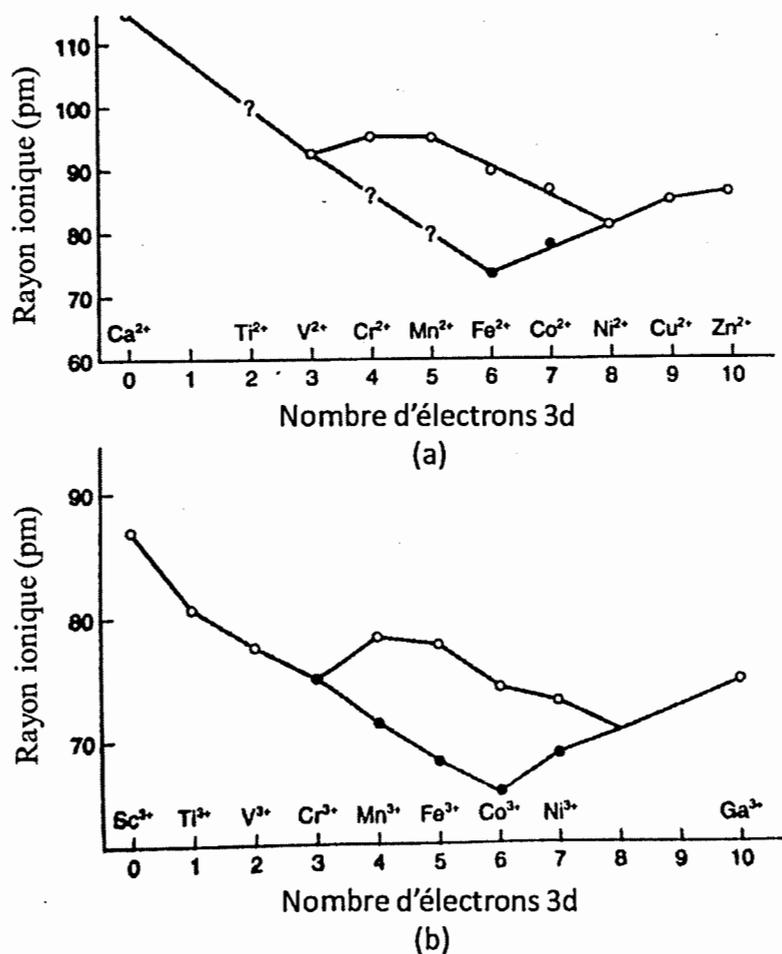


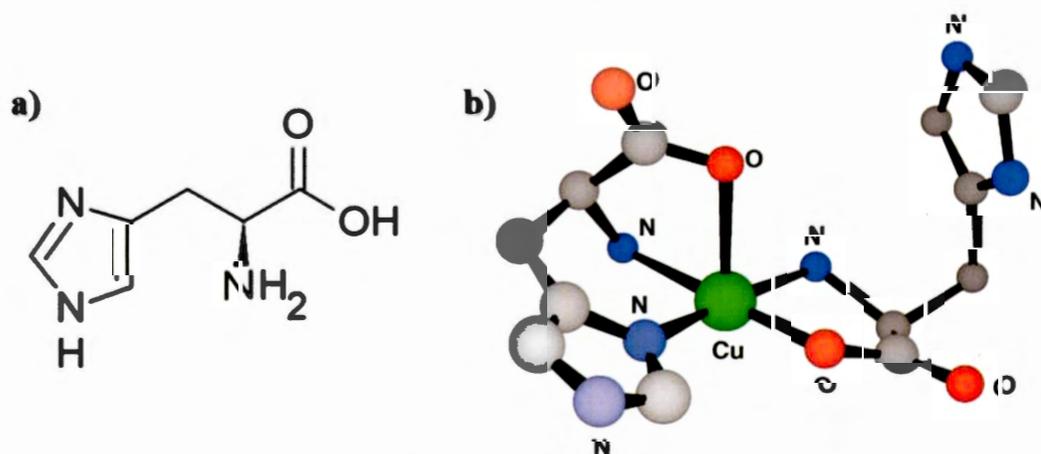
Figure 1.5 Rayon atomique des métaux de la série d. D'après (Wulfsberg, 2002)

### 1.3.2 L'histidine

L'histidine joue un rôle clé dans l'évolution chimique et la chimie prébiotique pour sa capacité d'auto-assemblage (l'auto-assemblage, de l'anglais *self-assembly*, est un processus de organisation spontanée des molécules générant un ordre supramoléculaire et des propriétés différents de celles de monomers). C'est un acide aminé essentiel qui possède un groupe imidazole (la partie résonante) lui donnant des propriétés d'intérêt (Fig. 1.6a). Plus précisément, le groupe imidazole de histidine est impliqué dans la plupart des sites de liaison des métalloenzymes en particulier au niveau du cuivre

(Creighton, 1993; Ebel et Rehder, 2006; Sundberg et Martin, 1974). L'histidine est liée à des fonctions catalytiques et est présente dans le site actif de plusieurs enzymes associées au transfert d'électrons. L'histidine a non seulement une polyvalence structurelle et catalytique, mais elle possède également la polyvalence métabolique, étant un précurseur des dérivés d'acides aminés méthylés tels que l'alanine, la méthionine. (Richardson *et al.*, 1975).

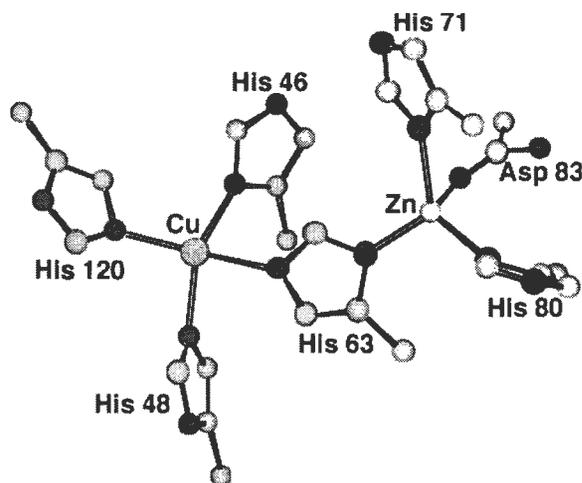
Le complexe bis(L-histidine)cuivre(II) est impliqué dans le transport du cuivre avant son entrée dans les systèmes de transport cellulaire (**Fig. 1.6b**). Des preuves de l'existence d'un complexe de coordination tertiaire entre l'albumine, le cuivre(II) et la L-histidine dans des conditions physiologiques ont été présentées (Balamurugan et Schaffner, 2006). Les propriétés de transport du bis(L-histidine)cuivre(II) ont conduit à son application au traitement de la maladie de Menkes, une maladie neurodégénérative génétique mortelle (Deschamps *et al.*, 2005).



**Figure 1.6** Structure de l'histidine (a) et du complexe  $[Cu(His)_2]$  (b).

L'histidine participe à la coordination des ions cuivre dans plusieurs protéines à cuivre, y compris le superoxyde dismutase (SOD), la céruloplasmine (CP), l'ascorbate oxydase, etc. L'ion imidazolate est présent sous forme d'un ligand entre les ions cuivre et zinc dans le superoxyde dismutase (CuZn-SOD) (**Fig. 1.7**).

Parmi tous les acides aminés, la L-histidine est l'un des plus puissants ligands de coordination aux métaux et joue un rôle important dans la liaison des ions métalliques. La L-histidine a trois sites potentiels de liaison des métaux (**Fig. 1.6b**) : l'oxygène du carboxylate ( $O_{\text{carboxyl}}$ ), l'azote de l'imidazole ( $N_{\text{im}}$ ) et l'azote de l'amine ( $N_{\text{am}}$ ). L'azote de l'imidazole des résidus L-histidine constitue souvent l'atome principal par lequel les ions métalliques sont liés aux protéines. Le système est anormal, probablement parce que, bien que le métal puisse se coordonner aux groupes amine, imidazole ou carboxyle de l'histidine, une configuration supposée plane des complexes cuivriques ne permet de lier simultanément que deux sites d'une d'histidine (Gala *et al.*, 2014). De cette manière, l'anion ligand histidine ( $L^-$ ) et le zwitterion ( $HL^+$ ) peuvent agir comme des espèces chélatantes, donnant les complexes différents,  $[CuL]^+$ ,  $[CuHL]^{2+}$ ,  $[CuL_2]$ ,  $[CuHL_2]^+$  et  $[Cu(HL)_2]^{2+}$  (Deschamps *et al.*, 2005).



**Figure 1.7** Représentation schématique du site actif de CuZn-SOD. D'après (Richardson *et al.*, 1975)

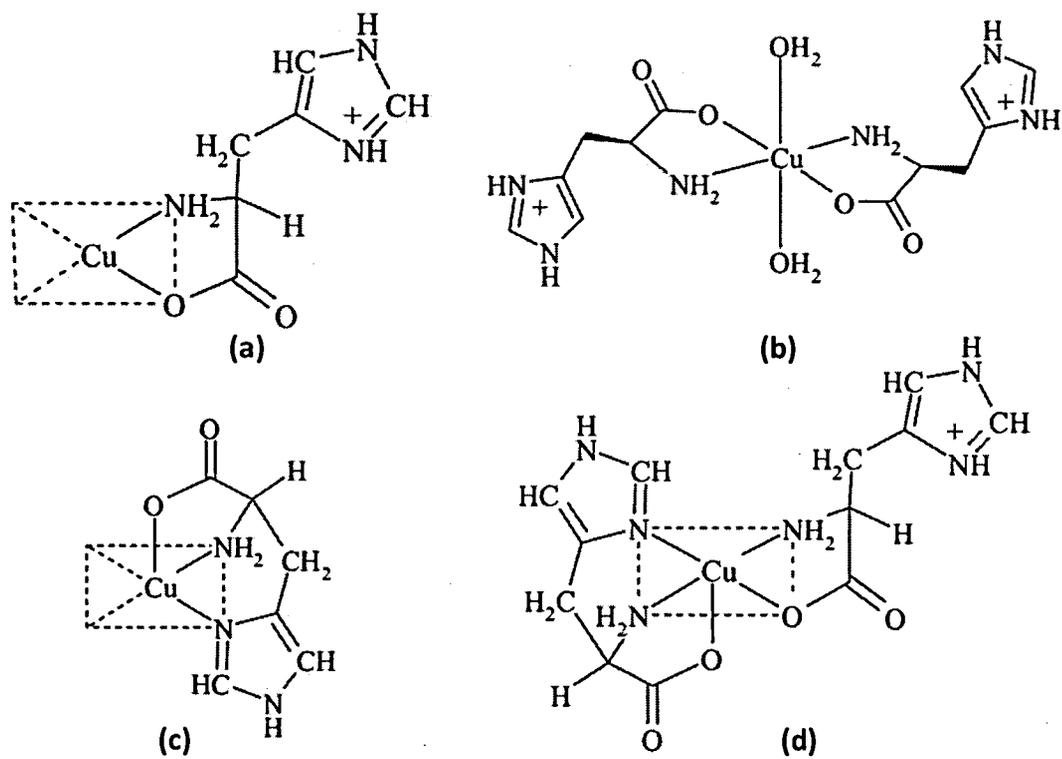
En outre, l'histidine est impliquée dans le transport du cuivre vers des cellules *in vivo*, à partir d'albumine. Une petite fraction de cuivre(II) liée à L-histidine maintient une réserve de cuivre(II) échangeable, en équilibre avec l'albumine dans le sang humain. L'échange de cuivre(II) entre la L-histidine et l'albumine module la disponibilité du

cuivre. En solution aqueuse, le système cuivre(II)-L-histidine assume divers modes de coordination en fonction de la valeur du pH. Des complexes mono- et bis-L-histidine ont été identifiés. Dechamps *et al.* 2005, décrivent des structures prédictives à partir des études réalisées en solution et de celles déterminées par la diffraction des rayons X sur un cristal unique.

À pH 2, l'espèce prédominante est MHL (M : métal; H : hydrogène; L : ligand). La localisation du proton ionisable dans MHL est incertaine. Les résultats de IR semblent indiquer clairement les liaisons  $N_{im}$  de l'imidazole et les liaisons carboxyle-oxygène- $O_{carboxyle}$ . Valensin *et al.* (1985) et Deschamps *et al.* (2005) suggèrent qu'en dessous de pH 3, le groupe imidazole de la L-histidine (**Fig. 1.8a**) n'est pas impliqué dans la liaison au Cu (Valensin *et al.*, 1985).

Evertsson (1969) a décrit la structure obtenue par rayons X de cette espèce qui a été cristallisée à partir d'une solution aqueuse (pH 3.7). La structure des espèces ML est présentée dans la **Figure. 1.8c**; espèce cationique de l'isomère trans  $MH_2L_2$  a montré que deux atomes de  $N_{am}$  et deux atomes d' $O_{carboxyle}$  sont coordonnés à l'ion  $Cu^{2+}$  (Evertsson, 1969).

La structure de  $MHL_2$  (**Fig. 1.8d**) est considérée comme une combinaison d'un ligand tridentate de L-histidine avec un groupe carboxylate axial faiblement coordonné et d'un ligand bidenté L-histidine en solution (Deschamps *et al.*, 2005). La configuration des complexes de Cu(II) / His en solution à différents pH a été étudiée par Sarkar et ses collaborateurs à l'aide de la RMN à l'état solide. Ils ont proposé des modèles de liaison Cu(II) / His à différentes pH, vérifiés par des calculs théoriques DFT (de l'anglais : Density Functional Theory) (Deschamps *et al.*, 2005). Ils ont aussi rapporté l'isolation et la résolution de la structure par analyse de rayons X de l'espèce physiologique  $ML_2$ .

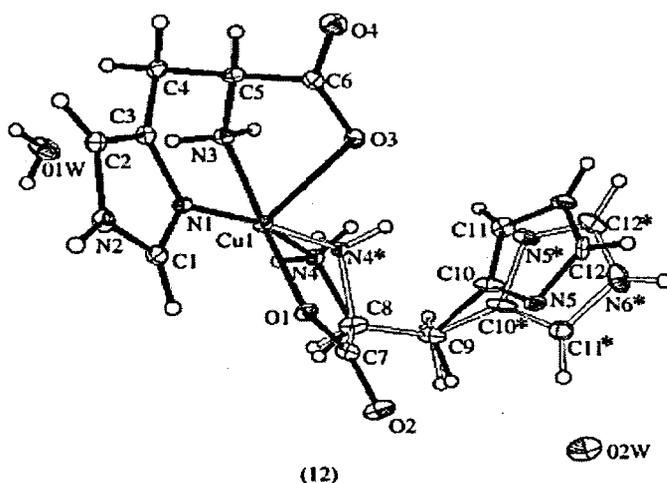


**Figure 1.8** Différentes structures des complexes de cuivre-histidine obtenues par diffraction des rayons X. (a) MHL, (b)  $MH_2L_2$ , (c) ML, (d)  $MHL_2$  D'après (Deschamps *et al.*, 2005).

La **figure 1.9** montre la structure cristalline obtenue par analyse de rayons X de  $ML_2$ , un complexe neutre à cinq coordonnées carrées et distordues. Un des ligands de la L-histidine agit comme une forme bidentée monoanionique par le biais d'atomes de  $N_{am}$  et d' $O_{carboxyle}$ , tandis que l'autre se lie en un ligand monoanionique tridenté au centre du cuivre(II) par l'intermédiaire de ses atomes  $N_{am}$ ,  $N_{im}$  et  $O_{carboxyle}$ . L'atome d' $O_{carboxyle}$  se trouve dans une position axiale.

La spectroscopie d'absorption des rayons X étudie l'absorption en fonction de l'énergie du rayonnement. Un rayonnement de faible énergie est peu absorbé mais lorsque

l'énergie augmente, il survient une brusque augmentation de l'absorption, c'est le seuil d'absorption. Le seuil K est la région spectrale qui correspond aux énergies de transitions des orbitales 3d des métaux de transition et est étudiée par la méthode XANES (de l'anglais : *X-ray Absorption Near Edge Structure*, spectroscopie de structure près du seuil d'absorption des rayons X). La structure des seuils dépendra des distances métal-ligands. La partie lointaine du spectre est étudiée par la spectroscopie EXAFS (de l'anglais : *Extended X-ray Absorption Fine Structure*, structure fine d'absorption étendue des rayons X) et correspond à l'éjection d'un électron.

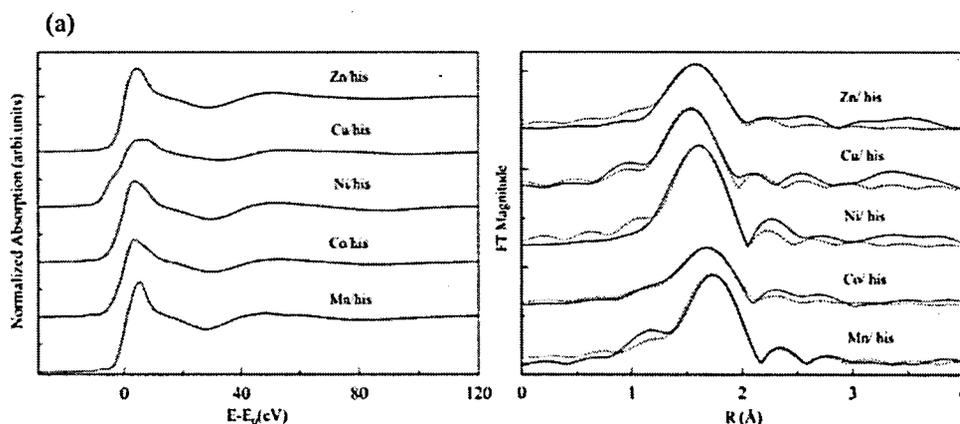


**Figure 1.9** Structure cristalline aux rayons X du complexe ML2 (O2W : la molécule d'eau). D'après (Deshamps *et al.* 2005).

La géométrie des complexes métal-histidine à pH 6.0 et de stoechiométrie métal :histidine 1 :2, est de type octaédrique déformée. La configuration en solution de différents ions de métaux de transition divalents avec la L-histidine a été étudiée par la spectroscopie d'absorption des rayons X (**Fig. 1.10**) avec les méthodes XANES et EXAFS (Sarkar et Wigfield, 1967).

Leurs études ont montré que les complexes de l'histidine avec Cu(II) et Zn(II) ont des configurations plus désordonnées que les complexes avec Mn(II), Co(II) et Ni(II).

La longueur des liaisons entre l'histidine et les ions métalliques est représentative de la stabilité des complexes. Elle suit l'ordre de la série d'Irving-Williams, qui stipule que la stabilité des complexes à spin élevé formés par les ions divalents des métaux de transition de la première rangée suit l'ordre de la série (page 17).



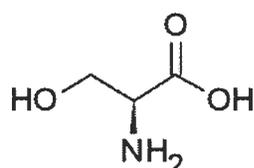
**Figure 1.10** Spectroscopie des rayons X au seuil K du Zn, Cu, Ni, Co et Mn des cinq solutions Métal / Histamine. (a) comparaison des spectres XANES et (b) ajustement des spectre EXAFS. D'après (Sarkar et Wigfield, 1967).

### 1.3.3 La L-Sérine

La L-sérine (Ser) est un acide aminé non essentiel qui peut être synthétisé par de nombreuses cellules, à l'exception de certains types de cellules, telles que les sous-populations de cellules gliales neuronales qui dépendent de l'absorption de Ser pour assurer leur survie et leur développement. (Fig. 1.11). Elle a des propriétés essentielles dans la biosynthèse des purines et des pyrimidines, préservant l'état normal du système immunitaire, participant à la formation de sites actifs de plusieurs enzymes et servant de précurseurs à plusieurs autres acides aminés producteurs de protéines, tels que la glycine, la cystéine et le tryptophane.

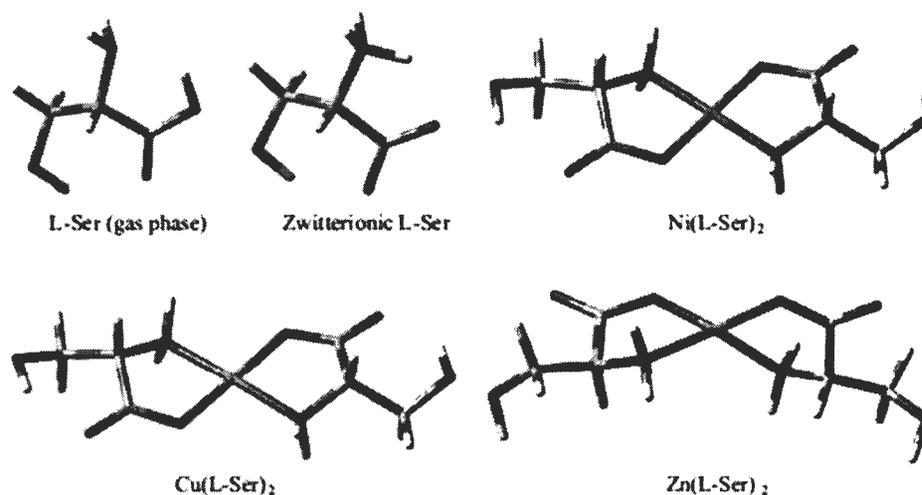
Des études expérimentales et théoriques ont révélé que la sérine se lie de manière bidentée à la plupart des ions métalliques. La synthèse et la caractérisation des

complexes Pt(II) de L-Ser ainsi que et les aspects caractéristiques thermodynamiques de la formation de complexes entre les ions de métal de transition 3d et le L-Ser en solution aqueuse ont été étudiés.



**Figure 1.11** Structure de la sérine.

Des études sont également disponibles sur la thermodynamique caractéristique de la formation des complexes entre les ions métalliques de transition 3d et L-Ser en solution aqueuse (Kochergina et Drobilova, 2009) et sur les constantes de stabilité de ces complexes (Sharma, 1967). Mandal *et al.* 2015 ont rapporté que la géométrie du complexe  $Zn(L-Ser)_2$  était presque tétraédrique, tandis que les géométries pour les complexes  $Ni(L-Ser)_2$  et  $Cu(L-Ser)_2$  étaient de type plan carré (**Fig. 1.12**).

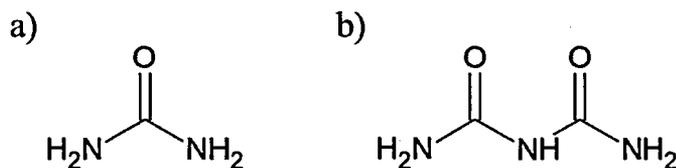


**Figure 1.12** Structures optimisées de la L-Ser et de ses complexes métalliques. D'après (Mandal *et al.*, 2015).

Des calculs théoriques ont été effectués sur les complexes [glycine-Cu]<sup>+</sup>, [sérine-Cu]<sup>+</sup> et [cystéine-Cu]<sup>+</sup>. L'étude de plusieurs types de structures pour chaque complexe montre que le site de liaison préféré de Cu<sup>+</sup> implique une chélation entre l'oxygène du carbonyle et l'azote de l'amine. Une chélation supplémentaire avec le groupe alcool de la sérine ou le groupe thiol de la cystéine conduit à des énergies de liaison plus importantes, la cystéine se liant plus fortement que la sérine, en bon accord avec une échelle expérimentale d'affinités relatives avec le Cu<sup>+</sup> (Hoyau et Ohanessian, 1997).

#### 1.4 Les complexes de cuivre avec de l'urée

L'urée est physiologiquement très importante; c'est le principal produit azoté du métabolisme des protéines. Elle a un point de fusion de 132 °C et est soluble dans l'eau et l'éthanol, mais insoluble dans l'éther. L'urée est une molécule organique hautement polaire (**Fig. 1.13**) largement utilisée dans l'alimentation des animaux comme source d'azote à faible coût pour favoriser la croissance, sous forme d'engrais pour le sol (George *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 2014), pour préparer les barbituriques (Finar, 1973), sous forme de résine formaldéhyde-urée pour les plastiques (Ebdon, 1997), pour ramollir la cellulose (dans l'industrie papetière) et pour favoriser la guérison des plaies infectées, ainsi que de nombreuses autres applications dans le domaine médical (Crawford, 1925; Gnewuch et Sosnovsky, 1997).



**Figure 1.13** Structure (a) de l'urée et (b) du biuret.

Étant un produit endogène du catabolisme des protéines et des acides aminés, elle est présente à différentes concentrations dans le sang et dans divers organes (Duchesne *et al.*, 2001; Goodman, 2002).

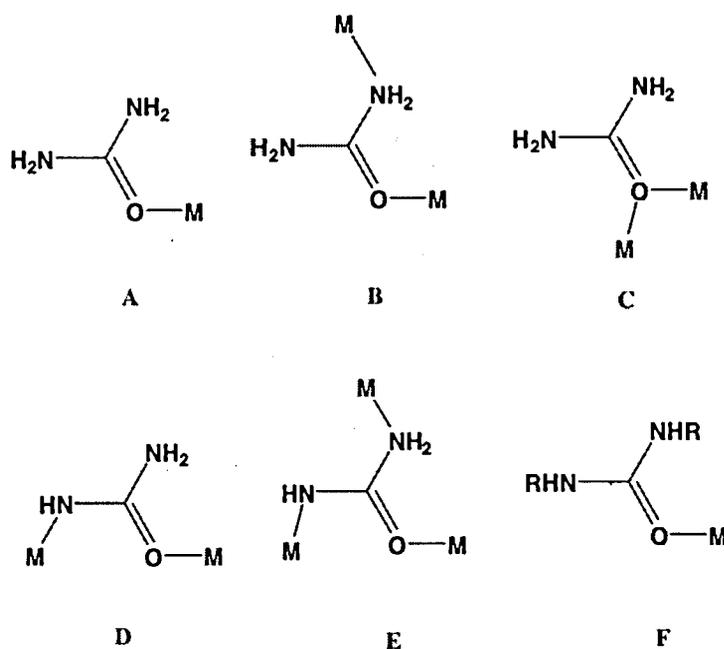
Au niveau des complexes d'urée avec des ions métalliques, certains sont utilisés comme engrais (Kim *et al.*, 1989). Les complexes d'urée avec le nitrate de zinc,  $[\text{Zn}(\text{urée})_4](\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , et le sulfate de zinc,  $[\text{Zn}(\text{urée})_6]\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , ont une application très importante dans ce domaine. Il a été constaté que ces complexes augmentaient davantage le rendement en riz qu'un mélange sec de sel d'urée-zinc. Le complexe de calcium et de nitrate-urée,  $[\text{Ca}(\text{urée})_4](\text{NO}_3)_2$ , a également été utilisé comme engrais pour adduits (Wang *et al.*, 2010).

Dans la circulation systémique, l'urée à haute concentration est considérée comme toxique et provoque des perturbations dans de nombreux processus cellulaires (Burg *et al.*, 2007). Cependant, à faible concentration, l'urée offre une protection des organes vitaux (cerveau, foie, cœur) contre les dommages dus à la peroxydation des lipides (Lukash *et al.*, 1980). Des études antérieures ont montré que l'urée agissait en tant qu'antioxydant et agent cardioprotecteur (Wang *et al.*, 1999) offre une protection contre les lésions oxydatives dans l'hyponatrémie (Soupart *et al.*, 2002). Compte tenu de la forte incidence de l'urée dans la vie quotidienne, il était intéressant d'étudier son impact sur les neurones.

Les études sur les complexes métalliques de l'urée ont été nombreuses ces dernières décennies et le développement des méthodes instrumentales a permis une compréhension plus claire des structures cristallines et moléculaires, du nombre de coordination de ces complexes métalliques (Theophanides et Harvey, 1987). L'urée possède trois sites de coordination : l'oxygène du groupe carbonyle et les deux atomes d'azote. Néanmoins, malgré ces trois possibilités, l'urée agit habituellement comme un ligand monodenté.

L'urée est généralement coordonnée en tant que ligand monodenté, par l'atome d'oxygène, formant ainsi un angle  $\text{C}=\text{O} \cdot \text{M}$  inférieur à  $180^\circ$ , selon l'hybridation  $\text{sp}^2$  de l'oxygène (Fig. 1.14A). Le mode de coordination bidenté par N et O (Fig. 1.14B) a été

trouvé dans un nombre limité de cas (Salman, 2012; Theophanides et Harvey, 1987), alors que dans  $[\text{Hg}_2\text{Cl}_4(\text{urée})_2]^{2+}$  chaque molécule d'urée relie les deux atomes de Hg par l'atome d'oxygène (Fig. 1.14C).



**Figure 1.14** Les modes de coordination de l'urée avec les ions métalliques. D'après (Salman, 2012).

La capacité de l'urée à soutenir une déprotonation induite par un métal comporte des intérêts chimiques / biologiques (Ibrahim, 2012); le ligand monoanionique  $\text{H}_2\text{NCONH}^-$  adopte les modes de coordination  $\mu^2$  (un seul atome relie deux métaux)(Fig. 1.14D) et  $\mu^3$  (un seul atome relie trois métaux) (Fig. 1.14E). L'urée et ses dérivés tels que la N, N'-diméthylurée et la N, N'-diéthylurée se coordinent seulement en tant que ligands monodentés à travers l'atome d'oxygène (Fig. 1.14F).

Le biuret est un diamide formé par la décomposition de l'urée par la chaleur. Il est souvent utilisé avec l'urée dans l'alimentation animale comme excellent additif azoté non protéique, offrant une meilleure palatabilité par rapport à l'urée (Currier *et al.*,

2004). Il contient deux groupes amide et un groupe amine secondaire (Fig. 1.13), une structure compatible avec son utilisation en tant que ligand neutre dans divers complexes, principalement pour des études structurales ou des applications bioanalytiques (dosage des protéines par le biuret). Des complexes de métaux de terres rares, d'actinides et de métaux alcalino-terreux (Raptis *et al.*, 2000) à base de ligands d'urée ou de biuret ont été décrits. Cependant, les complexes de métaux de transition tels que le cuivre avec ces ligands ont été rarement rapportés (Pop *et al.* 2002).

#### 1.5 Les complexes de cuivre thérapeutiquement actifs en tant qu'agents anticancéreux, anti-inflammatoires et antimicrobiens

L'intérêt actuel pour les complexes de cuivre vient de leur utilisation potentielle comme agent antimicrobien, antiviral, anti-inflammatoire, agents antitumoraux et inhibiteurs d'enzymes. L'action biochimique des complexes de cuivre et de médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) a été récemment étudié (Iakovidis *et al.*, 2011)

L'action antimicrobienne du cuivre était déjà connue des égyptiens qui s'en servaient pour stériliser l'eau. Il y a une centaine d'année, il fut observé que les travailleurs des mines de cuivre souffraient moins de tuberculose et les complexes de cuivre permirent de traiter la maladie. Certains agents thérapeutiques ont montré une activité accrue lorsque complexés et les propriétés antifongiques, bactéricides etc. pourraient être reliées à un meilleur transport des complexes à travers des membranes biologiques que pour les agents thérapeutiques non complexés (Hubin *et al.*, 2014).

Le cuivre est un oligo-élément essentiel qui participe à plusieurs processus biologiques chez tous les organismes vivants (O'Dell, 1976). Il se trouve principalement sous la forme cationique  $\text{Cu}^{2+}$  en tant que composante des protéines de cuivre (Bento *et al.*, 2007). Le  $\text{Cu}^{2+}$  libre, libéré lors de la perturbation de l'homéostasie du cuivre, peut devenir toxique par la génération rapide d'espèces oxygénées réactives (Flemming et Trevors, 1989). Des actions bénéfiques ont été rapportées pour plusieurs complexes de

cuiivre naturels. Par exemple, la céruloplasmine, protéine à cuivre, peut agir en tant qu'antioxydant et agent cardioprotecteur (Bento *et al.* 2007; Mateescu *et al.* 1995).

Les protéines de cuivre bleu, telles que les enzymes ascorbate oxydase et laccase, sont également fréquentes dans les légumes. De plus, de petites molécules biologiquement actives, telles que des complexes avec un acide aminé, capables de se lier et de transporter le cuivre ont diverses fonctions physiologiques et peuvent posséder des propriétés thérapeutiques (Gala *et al.*, 2014). Le cuivre(II)-L-histidine (complexe 1 : 2 à pH physiologique) a été largement utilisé dans le traitement de la maladie de Menkes, (maladie neurodégénérative génétique entraînant la mort précoce chez les enfants en raison d'une altération de l'absorption du cuivre). Une utilisation récente a été rapportée pour le traitement de la cardioencéphalomyopathie hypertrophique infantile, affection provoquée par des mutations de SCO2, un gène d'assemblage de la cytochrome c oxydase (COX) situé sur le chromosome 22 (Deschamps *et al.*, 2005).

Plusieurs complexes de cuivre tels que Dicaprene, Alcuprin et le salicylate de cuivre peuvent agir en tant qu'agents anti-inflammatoires qui aident à réduire les symptômes comme la douleur et raideur de la polyarthrite rhumatoïde (Sorenson et Hangarter, 1977). En outre, le Cu(II) ATSM (cuivre(II)-diacétyl-bis(N4-méthylthiosémi-carbazone)) et la kynurénine peuvent exercer des effets cardioprotecteurs (Srivastava *et al.*, 2016) et pourraient être bénéfiques dans le traitement des troubles neurodégénératifs tels que les maladies de Parkinson et d'Alzheimer (Klevay, 2008). Il a également été suggéré que la thérapie à cuivre pourrait avoir des résultats positifs dans le traitement de troubles neurodégénératifs Parkinson et d'Alzheimer. Certaines protéines à cuivre (ex : Cu(II) ATSM) auraient également des effets cardio-protecteurs (Sas *et al.*, 2007). Par exemple, la céruloplasmine, la protéine à cuivre bleue circulatoire, possède des propriétés antioxydantes, cardioprotectrices et neuromodulatrices (Mateescu *et al.* 1995).

La voie thérapeutique pour les agents anticancéreux a toujours été dépendante de la sélectivité de ces agents pour les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines normales. Bien que la chélation du Cu puisse inverser le déséquilibre en métal et supprimer les avantages de la croissance de la tumeur pour la croissance, une autre approche consiste à administrer des agents qui, lors de la liaison du Cu, induiraient de puissants effets cytotoxiques. Le mécanisme de la cytotoxicité inférée par les complexes de cuivre(II) peut être dû à leur capacité à se lier et à cliver l'ADN, ce qui entraîne un arrêt du cycle cellulaire et une apoptose (Jopp *et al.*, 2017; Yoshii *et al.*, 2001).

En dépit de la création de nouvelles chimiothérapies par la coordination des médicaments existants par le métal, les chercheurs ont également commencé à découvrir l'utilité de la coordination des métaux dans le développement de nouveaux médicaments. Avec l'apparition de *Plasmodium falciparum* résistant aux médicaments, il existe un besoin urgent de nouveaux antipaludéens. Un exemple est le complexe de Cu(II) avec la pyridine-2-carboxamidrazone. Ce complexe de cuivre a montré une activité antipaludique plus élevée *in vitro* par rapport au composé parental (Gokhale *et al.*, 2003).

Les maladies inflammatoires, telles que la polyarthrite rhumatoïde, sont un autre domaine dans lequel un traitement par des complexes de cuivre pourrait être bénéfique. Bien que de nombreux médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) soient disponibles sur le marché, ils sont associés à des toxicités rénales, gastro-intestinales et cardiovasculaires (Joseph et Nagashri, 2012). La plupart des maladies inflammatoires chroniques telles que l'asthme, la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) et la polyarthrite rhumatoïde sont associées à une activité réduite de la SOD, entraînant un stress oxydatif chronique et une inflammation (Joseph et Nagashri, 2012; Oberley-Deegan *et al.*, 2009; van den Berghe *et al.*, 2007).

Comme mentionné ci-dessus, le cuivre est un oligo-élément essentiel requis par tous les organismes vivants. Contrairement au cuivre lié à des protéines ou à des peptides, le cuivre non lié peut être hautement toxique en raison de sa capacité à générer des radicaux libres via la réaction de Fenton. Le chapitre suivant présente des aspects liés au stress oxydants en relation avec des cations  $\text{Cu}^{2+}$  et des complexes de cuivre (II).

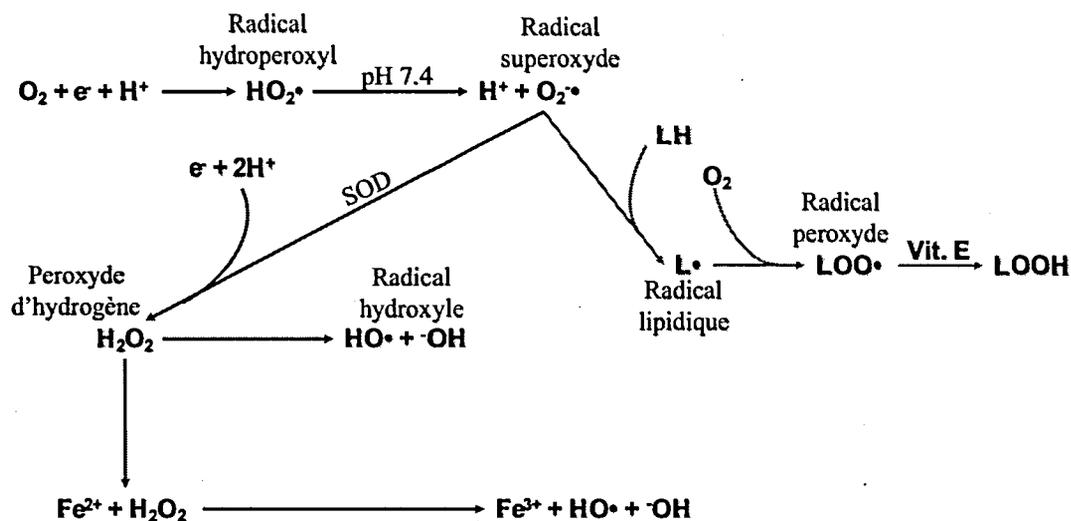
## CHAPITRE II

### LES DOMMAGES OXYDATIFS ET LES FACTEURS ANTIOXYDANTS ENDOGENES ET EXOGENES

#### 2.1 Le stress oxydatif

Le concept de stress oxydatif a été introduit en biologie et en médecine depuis plus de 30 ans. Les phénomènes d'oxydation sont fondamentaux pour la vie car ils participent aux processus d'obtention d'énergie cellulaire. Cependant, lorsqu'il y a un excès d'oxydation, apparaît un stress oxydatif qui est une réalité complexe en biologie et qui ne peut pas être mesuré ou défini avec un seul paramètre. Chaque processus d'oxydation est toujours accompagné d'un processus de réduction. Ce sont des réactions rédox des radicaux entre les paires conjuguées (**Fig. 2.1**).

Le stress oxydatif est causé par une diminution des antioxydants défensifs et/ou une augmentation de la production d'espèces réactives. Cette défense est constituée de différentes substances et mécanismes qui jouent un rôle fondamental et le déséquilibre du rapport antioxydants/ prooxydants conduisant à l'augmentation des espèces radicalaires.



**Figure 2.1 Réactions rédox des radicaux.** Les flèches vertes représentent la peroxydation lipidique. Les flèches bleues représentent les réactions de Haber – Weiss et les flèches rouges représentent les réactions de Fenton. Les lettres en gras représentent des radicaux ou des molécules ayant le même comportement ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). SOD : la superoxyde dismutase. D'après (Carocho et Ferreira, 2013).

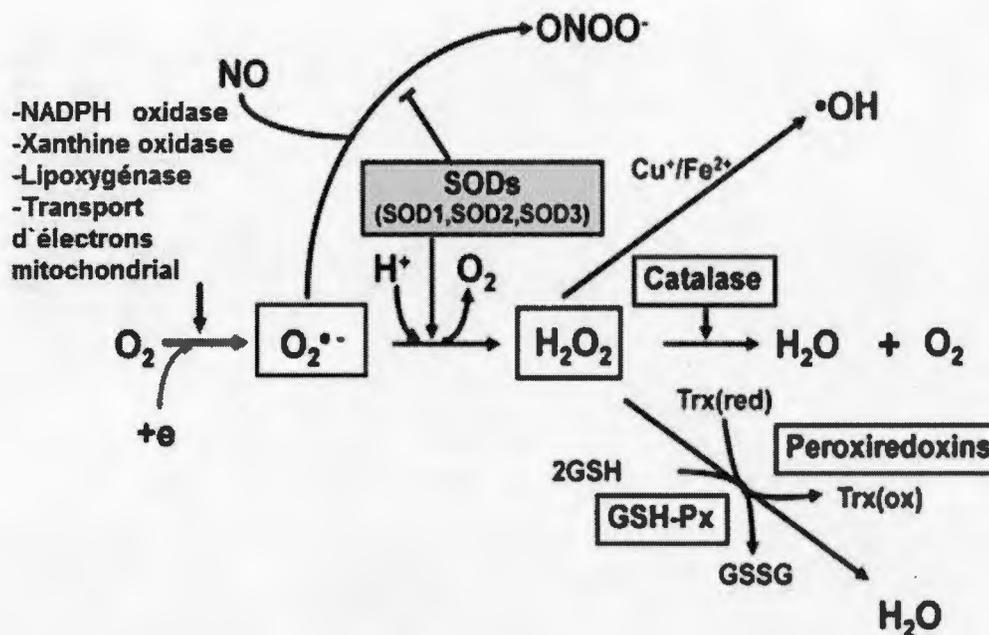
### 2.1.1 Les sources endogènes de dérivés réactifs oxygénés

L'environnement contient de l'oxygène, vital pour tous les organismes aérobies et des espèces réactives d'oxygénés (ROS) se forment dans les cellules à la suite du métabolisme aérobie. Les ROS sont produits à partir d'oxygène moléculaire suivant un métabolisme cellulaire normal et font partie d'un groupe plus large, les espèces réactives (RS, de l'anglais *reactive species*). Les RS sont divisées en différentes catégories; les ROS, les dérivés réactifs azotés (RNS), chlorés, bromés et soufrés. Les ROS peuvent être divisés en deux groupes : les radicaux libres et les espèces non-radicalaires. Les molécules contenant un ou plusieurs électrons non appariés et donnant ainsi une réactivité à la molécule sont appelées radicaux libres. Lorsque deux radicaux libres mettent en commun leurs électrons non appariés, des formes non radicalaires sont créées. Les trois principaux ROS d'intérêt physiologique sont l'anion superoxyde

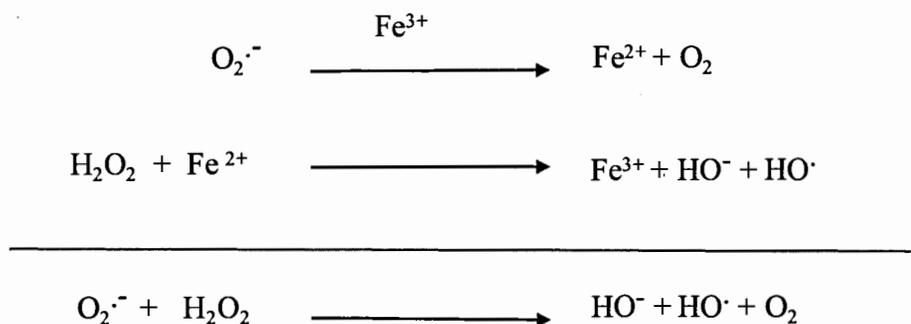
( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Les principales ROS radicalaires sont le radical superoxyde ( $\cdot O_2^{\cdot-}$ ), hydroxyle ( $\cdot OH$ ) et peroxyde ( $RO_2\cdot$ ) et des exemples de non-radicaux ROS sont le peroxyde ( $H_2O_2$ ) et l'oxygène  $O_2$ . Le radical superoxyde est formé par une réduction de l'oxygène.

Les ROS provoquent des dommages à différentes molécules biologiques, comme l'oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides ou des glucides (Pisoschi et Pop, 2015). Si les dommages et la formation de produits oxydants dépassent la capacité du système de défense, les ROS peuvent activer et/ou accélérer le processus de la maladie (par exemple MCV, cancer, diabète, maladies neurologiques, immunitaires et oculaires). Il existe également plusieurs sources de production d'oxydants exogènes. Les radicaux libres peuvent attaquer toutes les composantes biochimiques de la cellule mais les lipides, les protéines et les acides nucléiques sont les cibles les plus importantes. Les radicaux libres, en général, réagissent avec la première structure rencontrée, le plus souvent étant les lipides de la cellule ou des membranes d'organelles (Sarniak *et al.*, 2016).

Bien que la chaîne de transport d'électrons au niveau de la membrane mitochondriale soit très efficace, certains électrons peuvent fuir et réduire la molécule d'oxygène en  $O_2^{\cdot-}$  (Fig. 2.2). Les mitochondries constituent une source majeure d' $O_2^{\cdot-}$ . La NADPH oxydase est présente dans les leucocytes, les monocytes et les macrophages polymorphonucléaires. Lors de la phagocytose, ces cellules produisent une expulsion de superoxyde qui conduit à une activité bactéricide. Le superoxyde est transformé en peroxyde d'hydrogène par l'action de la SOD. Le peroxyde d'hydrogène diffuse facilement à travers la membrane plasmique. La xanthine oxydase, l'acide aminé oxydase et le NADPH produisent également du peroxyde d'hydrogène (Fukai et Ushio-Fukai, 2011), ainsi que les peroxysomes par la consommation d'oxygène moléculaire dans les réactions métaboliques.



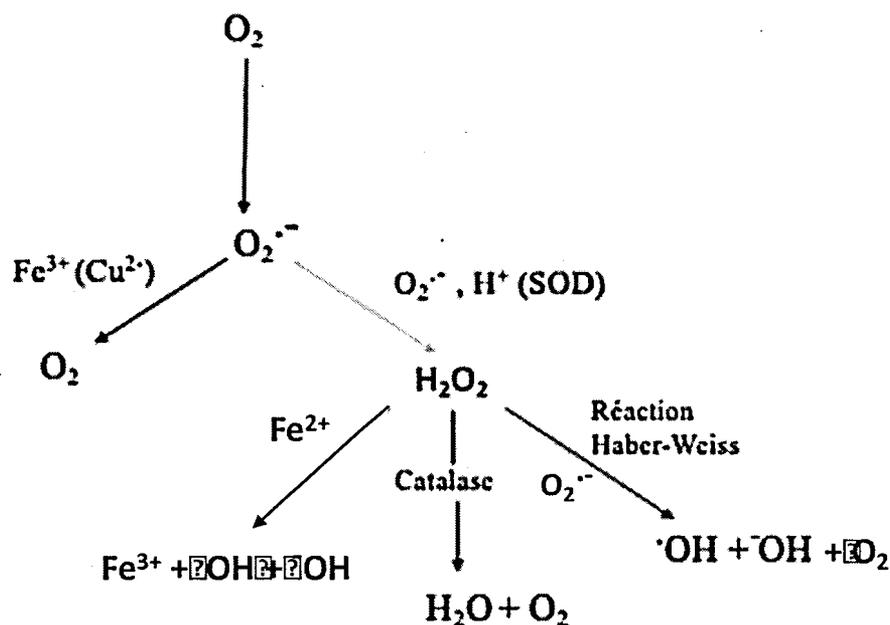
**Figure 2.2 Métabolisme d'espèces réactives de l'oxygène.** Génération et métabolisme d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Le superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) est produit par la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, la lipoxygénase et les enzymes mitochondriales. Le superoxyde est converti par la SOD en  $H_2O_2$ , qui est ensuite réduit en eau par la catalase, et indirectement par les glutathion peroxidases (GPx) et les peroxiredoxines (Prx). En présence de métal de transition réduit ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^+$ ),  $H_2O_2$  peut subir une conversion spontanée en radical hydroxyle ( $\bullet OH$ ) ou en une espèce réactive associée au métal, qui est extrêmement réactive. L'oxyde nitrique (NO) peut être rapidement inactivé par réaction avec  $O_2^{\bullet-}$  et conduire à la production du peroxynitrite, un oxydant fort ( $ONOO^-$ ). La SOD constitue donc une première ligne de défense contre la toxicité des radicaux superoxydes anioniques. L'enzyme participe également à la signalisation cellulaire via la régulation des ROS (par exemple,  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ) et du NO disponible. D'après (Fukai et Ushio-Fukai, 2011).



**Figure 2.3 Mécanismes des réactions de Fenton et Haber-Weiss.** D'après (Haber et Weiss, 1934).

Dans une succession de réactions appelées réactions de Haber-Weiss (**Fig. 2.3**) et de Fenton (**Fig. 2.4**),  $\text{H}_2\text{O}_2$  peut générer  $\text{HO}^-$  en présence de métaux de transition tels que  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$  (Carocho et Ferreira, 2013).

La production endogène de ROS se produit *in vivo* en tant que sous-produits de la chimie rédox enzymatique, dont la réaction oxydative est catalysée par les ions de fer et d'autres métaux. La production de ROS provoque des dommages progressifs de l'ADN nucléaire, de l'ADN mitochondrial, de l'ARN, des enzymes, d'autres protéines ainsi que des acides gras insaturés et des phospholipides. Ces types de dommages peuvent entraîner des dommages aux cellules, une modification de la fonction des cellules et finalement une mort cellulaire (Babusikova *et al.*, 2012).



**Figure 2.4** Représentation schématique de la réaction de Fenton. Initialement, les donneurs d'électrons peuvent convertir l'oxygène en anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), qui est rapidement converti en peroxyde d'hydrogène. SOD; superoxyde dismutase. D'après (Barbusinski, 2009).

### 2.1.2 Les sources exogènes d'espèces réactives oxygénés

Les radiations ionisantes, en présence de  $O_2$ , produisent les radicaux hydroxyle, les superoxydes et les radicaux organiques en peroxyde d'hydrogène et en hydroperoxydes organiques. Ces espèces d'hydroperoxydes réagissent avec les ions métalliques actifs d'oxydo-réduction, tels que Fe et Cu, via des réactions de Fenton et induisent ainsi un stress oxydatif. Les ions de métaux lourds, tels que le fer, le cuivre, le cadmium, le mercure, le nickel, le plomb et l'arsenic, peuvent induire la génération de radicaux réactifs et causer des dommages cellulaires via la diminution des activités enzymatiques, par la peroxydation des lipides et la réaction avec les protéines nucléaires et l'ADN (Dalecki *et al.*, 2017).

L'un des mécanismes les plus importants de la génération de radicaux libres par présence un métal se fait via une réaction de type Fenton. La réaction de Fenton est une réaction d'oxydation avancée qui consiste des réactions de décomposition du  $H_2O_2$  par des sels métalliques afin de générer des espèces radicalaires. L'ion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène peuvent interagir avec les métaux de transition, tels que le fer et le cuivre, via la réaction de Haber-Weiss / Fenton catalysée par un métal pour former des radicaux  $\bullet OH$  (Haber et Weiss 1934).

## 2.2 Les antioxydants

Les antioxydants étaient caractérisés comme « toute substance à faible concentration comparée à un substrat oxydable, qui retardaient ou interdisaient remarquablement l'oxydation de ce substrat » (Halliwell, 1995); ils ont ensuite été décrits comme «toute substance qui inhibe ou retarde l'oxydation de ce substrat», ou « élimine les dommages oxydatifs causés à une molécule cible » (Halliwell, 2007). L'une des caractéristiques de l'antioxydant est la capacité, après le piégeage du radical, à produire un nouveau radical permanent par liaison hydrogène intramoléculaire lors d'une oxydation ultérieure (Halliwell et Gutteridge, 1990).

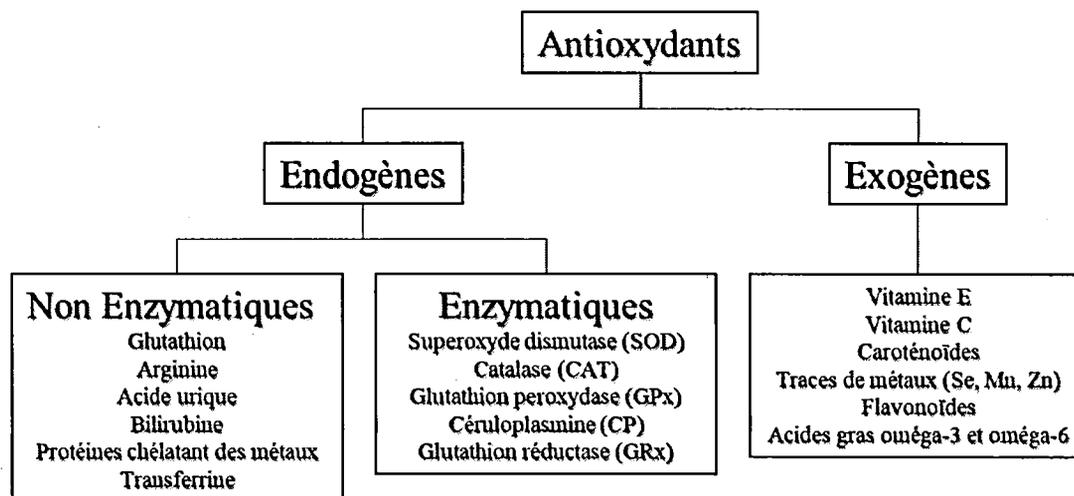
La stabilité de l'activité antioxydante a été indiquée par différentes approches : (i) en tant qu'inhibiteurs de réactions d'oxydation des radicaux libres (oxydants préventifs) en inhibant la formation des radicaux lipidiques libres; (ii) en interrompant la propagation de la réaction d'auto-oxydation en chaîne (antioxydants cassants); (iii) comme extincteurs d'oxygène singulet; par synergie avec d'autres antioxydants; (iv) en tant qu'agents réducteurs qui transforment l'hydroperoxyde en composés stables; (v) en tant que chélateurs de métaux qui transforment les oxydants métalliques (dérivés du fer et du cuivre) en produits stables; (vi) comme inhibiteurs d'enzymes pro-oxydantes comme les lipooxygénases (Darmanyan *et al.*, 1998; Heim *et al.*, 2002; Kancheva, 2009; Min et Boff, 2006; Pokorný, 2007).

Les mécanismes de défense antioxydante contre les dommages oxydatifs reconnus comprennent : (i) des mécanismes de prévention; (ii) des mécanismes de réparation; et (iii) les défenses antioxydantes (Valko *et al.*, 2007). Les antioxydants produits dans l'organisme sont classifiés comme antioxydants endogènes et ceux qui sont fournis de l'extérieur à travers les aliments sont souvent considérés comme antioxydants exogènes (Fig. 2.5). Le corps humain est équipé d'une variété d'antioxydants qui servent à contrebalancer l'effet des oxydants et ils peuvent être divisés en deux catégories : enzymatiques et non enzymatiques.

Les antioxydants enzymatiques sont séparés en défenses enzymatiques primaires et secondaires. La défense principale est constituée de trois enzymes en particulier qui interdisent la production ou la neutralisation des radicaux libres : la glutathion peroxydase donne deux électrons pour réduire les peroxydes comme substrat potentiel de la réaction de Fenton; la catalase transforme le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire; et finalement, la superoxyde dismutase transforme les anions superoxyde en peroxyde d'hydrogène en tant que substrat pour la catalase (Rahman, 2007).

La défense enzymatique secondaire est constituée de la glutathion réductase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase. La glutathion réductase réduit le glutathion (antioxydant) de sa forme oxydée à sa forme réduite, le recyclant donc pour continuer à neutraliser davantage de radicaux libres. Le glucose-6-phosphate régénère le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate- coenzyme) en produisant un environnement réducteur (Gamble et Burke, 1984; Ratnam *et al.*, 2006). Il existe un grand nombre d'antioxydants endogènes non enzymatiques, tels que les vitamines (A), les cofacteurs enzymatiques (Q10), les composés azotés (acide urique) et les peptides (glutathion) et antioxydants endogènes enzymatiques tels que la superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), céruloplasmine (CP) et glutathion reductase (GRX). Les

antioxydants exogènes sont, entre autre, la vitamine E, la vitamine (C), les caroténoïdes ( $\beta$ -carotène).



**Figure 2.5** Antioxydants endogènes et exogènes. D'après (Halliwell, 2007).

### 2.2.1 Les antioxydants endogènes

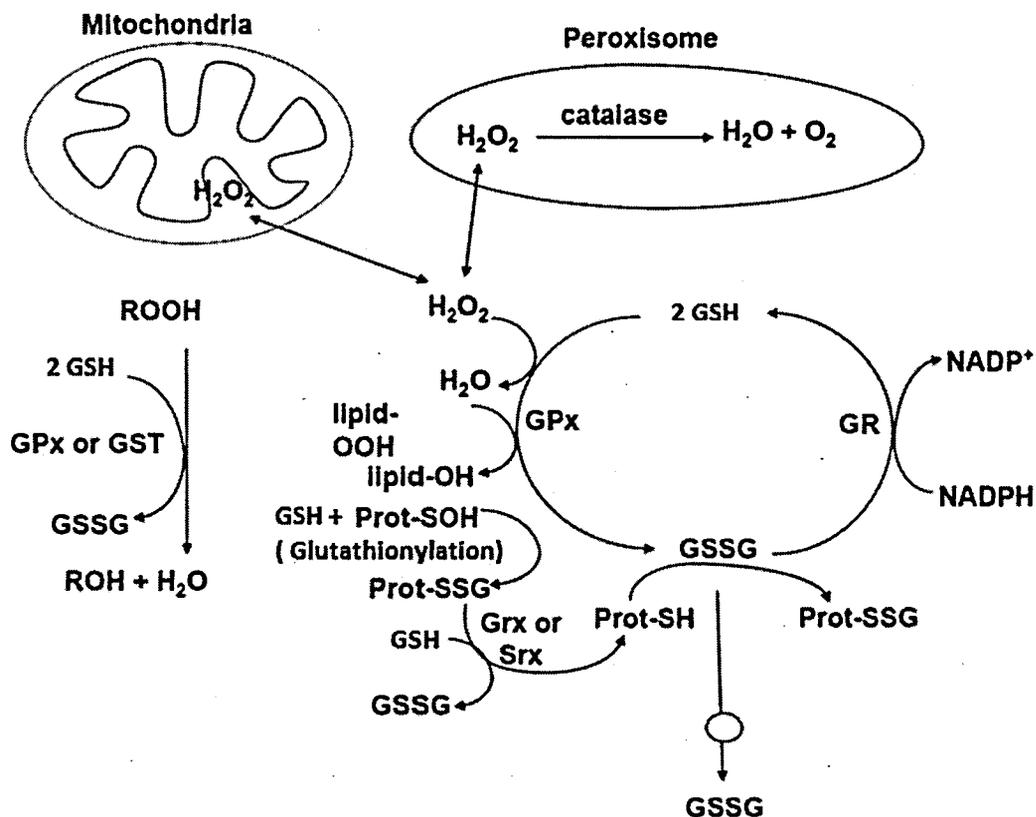
Les antioxydants sont très rapides pour neutraliser toute molécule susceptible de devenir un radical libre ou tout radical libre capable d'induire la production d'autres radicaux. Les trois enzymes clés figurant en tête de liste sont la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase.

#### *Le glutathion et la glutathion peroxydase*

Le glutathion est l'un des antioxydants les plus étudiés. Cela est probablement dû au fait qu'il est synthétisé de manière endogène dans tout le corps et qu'il se trouve essentiellement dans toutes les cellules, parfois à des concentrations assez élevées (Kerksick et Willoughby, 2005).

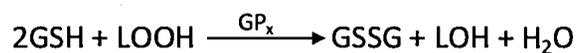
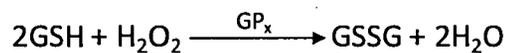
Le glutathion (GSH) est connu pour être efficace dans la détoxification cellulaire. Il protège les cellules en réduisant les dérivés réactifs oxygénés (ROS) et en se liant aux métaux. Le GSH est un tripeptide fabriqué à partir d'acide glutamique (Glu), de

cystéine (Cys) et de glycine (Gly). Il constitue également le principal composé thiol produit par les animaux, les plantes, les algues et les bactéries (Giovanelli *et al.*, 1980; Noctor et Foyer, 1998). Les principales fonctions de protection contre le stress oxydatif du glutathion est illustrée à la **Figure 2.6**.



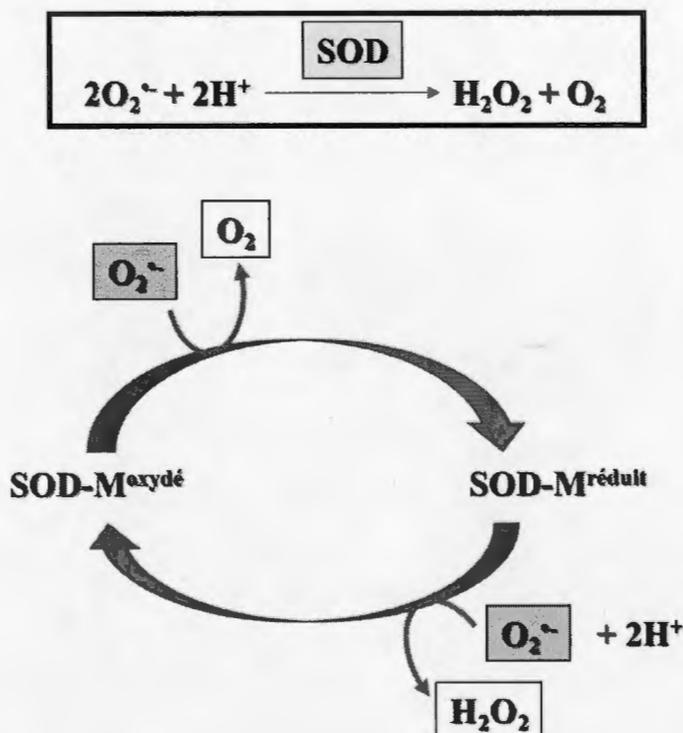
**Figure 2.6** Les principales fonctions de protection du glutathion contre le stress oxydatif. D'après (Lu, 2013).

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme cytosolique qui catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en alcools.



Les GPx ont la capacité de réduire le  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  en utilisant les capacités réductrices du couple Glutathion/Glutathion disulfure (GSH/GSSG). Cette réaction est importante pour éliminer les faibles concentrations de peroxyde d'hydrogène susceptibles d'endommager la cellule qui ne sont pas décomposées efficacement par la catalase (Cohen et Hochstein, 1963). Cofacteur des enzymes qui ont des fonctions détoxifiantes contre le stress oxydatif tel que glutathion peroxydase (GPx) et dans le piégeage direct de l'oxygène singulet et du radical hydroxyle, GSH est capable de régénérer à leurs formes actives les vitamines C et E par la réduction de vitamine. La capacité de glutathion de régénérer des antioxydants est liée avec l'état redox du couple-glutathion disulfures glutathion (GSSG / 2GSH) (Lu, 2013).

La superoxyde dismutase (SOD) est la enzyme de détoxification et le plus puissant antioxydant de la cellule. Elle est endogène et joue le rôle d'un système de défense de première ligne contre les dérivés réactifs oxygénés (ROS). Elle catalyse la dismutation de deux molécules d'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) en peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et en oxygène moléculaire ( $\text{O}_2$ ), rendant ainsi l'anion superoxyde potentiellement moins dangereux. Le mécanisme de dismutation de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  par la SOD implique la réduction et la réoxydation alternées d'un métal de transition redox actif, tel que le cuivre ou le manganèse sur le site actif de l'enzyme (Fig. 2.7). Cela indique que l'activité de la SOD nécessite un ion métal catalytique (Ighodaro et Akinloye, 2018).



**M<sup>oxydé</sup>/M<sup>r du </sup> : Cu<sup>2+</sup>/Cu<sup>+</sup> pour SOD1 et SOD3**  
**Mn<sup>3+</sup>/Mn<sup>2+</sup> pour SOD2**

**Figure 2.7** Mécanisme commun de piégeage de l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> par les SOD. D'après (Fukai et Ushio-Fukai, 2011). La catalase (CAT) est une enzyme commune dans presque tous les organismes vivants exposés à l'oxygène (bactéries, plantes et animaux). La catalase est un enzyme clé dans le métabolisme du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Son expression et sa localisation sont nettement modifiées dans les tumeurs (Glorieux et Calderon, 2017). Dans des conditions de stress, l'enzyme antioxydante catalase joue un rôle majeur en détoxifiant le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en le transformant en oxygène moléculaire et en H<sub>2</sub>O.

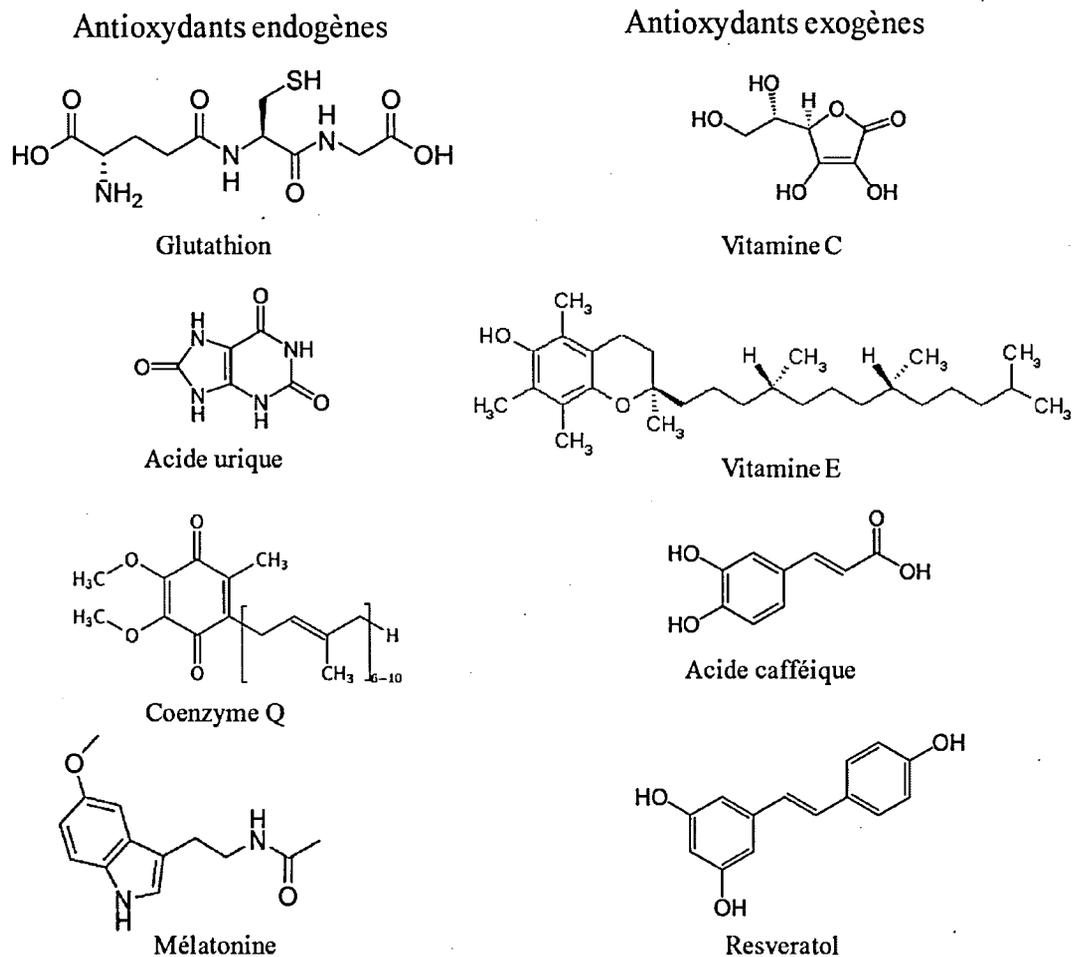


### 2.2.2 Les antioxydants exogènes

La vitamine E (**Fig. 2.8 et 2.9**) liposoluble est concentrée dans le site intérieur hydrophobe de la membrane cellulaire et constitue le principal moyen de défense contre les lésions membranaires induites par les oxydants. La vitamine E donne un électron au peroxyde, produit lors de la peroxydation des lipides et peut avoir un rôle protecteur dans la prévention ou minimisation des dommages causés par les radicaux libres reliés aux maladies cardiovasculaires, cancer et cataractes, entre autres (Cadenas et Packer, 1996). La vitamine E est constituée de huit isoformes, avec quatre tocophérols ( $\alpha$ -tocophérol,  $\beta$ -tocophérol,  $\gamma$ -tocophérol et  $\delta$ -tocophérol, dont les substituants du cycle aromatique diffèrent) et quatre équivalents tocotriénols, avec des insaturations. Le tocophérol est l'isoforme la plus puissante et la plus abondante dans les systèmes biologiques. Le groupe de tête chromane permet l'activité antioxydante des tocophérols, mais la queue de phytyle n'a aucun effet (Halpner *et al.*, 1998). Le tocopherol est également l'antioxydant naturel le plus efficace pour protéger contre la mort cellulaire oxydative les cellules neuronales cultivées.

La vitamine E arrête la peroxydation des lipides en donnant son hydrogène aux radicaux peroxyde formant des radicaux tocophéroxy qui, bien qu'ils soient également des radicaux, ne sont pas réactifs et sont incapables de poursuivre une réaction d'oxydation en chaîne. La vitamine E est le principal antioxydant soluble dans les chaînes lipidiques, présent dans le plasma, les globules rouges et les tissus, qui permet de préserver l'intégrité des structures lipidiques, principalement des membranes (Carocho et Ferreira, 2013).

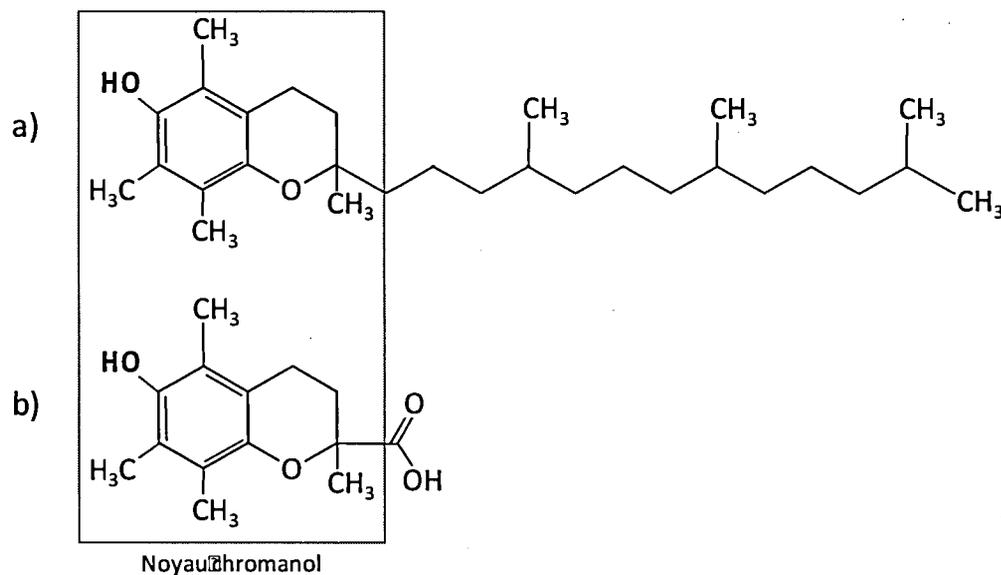
Le Trolox® (acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchroman-2-carboxylique) est un dérivé synthétique hydrosoluble dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E (**Fig. 2.9**). Il est souvent utilisé comme standard dans différentes méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes (Apak *et al.*, 2016).



**Figure 2.8** Structures des principaux antioxydants endogènes et exogènes. D'après (Pisoschi et Pop, 2015).

La vitamine E et le Trolox ont un noyau chromanol similaire. Ce noyau est responsable des propriétés antioxydantes pendant que la chaîne latérale des structures décide la polarité des molécules. Trolox, un composé chromanol carboxylé amphiphile, est devenu une norme largement utilisée pour l'évaluation des activités de piégeage des radicaux libres en termes de dosage de la « capacité équivalente en antioxydant

trolox », TEAC, de l'anglais : *Trolox equivalent antioxidant capacity* (Mader *et al.*, 2007).



**Figure 2.9** Structure de la molécule de vitamine E (a) et du Trolox® (b). Le noyau chromanol est responsable des propriétés antioxydantes.

La vitamine C (acide ascorbique) est un micronutriment hydrosoluble nécessaire avec multiples fonctions biologiques. Il est cofacteur de plusieurs enzymes, la biosynthèse de la carnitine, la conversion du neurotransmetteur dopamine en noradrénaline et le métabolisme de la tyrosine (Spector et Johanson, 2014). La vitamine C est un donneur d'électrons et donc un agent réducteur. Toutes les actions physiologiques et biochimiques connues de la vitamine C sont dues à son action en tant que donneur d'électrons. L'acide ascorbique donne deux électrons à partir d'une double liaison entre le deuxième et le troisième carbone de la molécule à 6 carbones (Fig 2.8). La vitamine C est appelée un antioxydant car, en donnant ses électrons, elle empêche l'oxydation d'autres composés. La vitamine C est aussi connue pour agir en tant que prooxydant *in vitro* (Pehlivan, 2017).

Les caroténoïdes sont un groupe de pigments naturels synthétisés par les plantes et les micro-organismes et ne sont pas synthétisés par les animaux. Ils peuvent être divisés en deux grandes catégories : les «carotènes», qui sont des hydrocarbures (a et b-carotène, lycopène) et les «xanthophylles» (lutéine, bixine, capsanthine, etc.), qui contiennent des groupes d'extrémités polaires reflétant une étape oxydative dans leur formation (Böhm *et al.*, 1997).

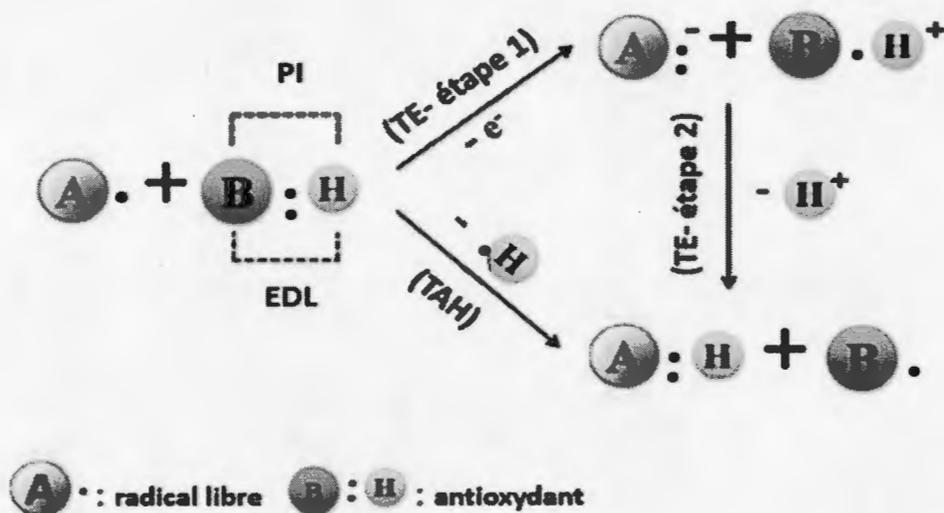
La principale caractéristique des caroténoïdes en tant qu'antioxydants est due à la désactivation de l'oxygène singulet qui se traduit par des caroténoïdes excités qui dissipent l'énergie nouvellement acquise par une série d'interactions rotationnelles et vibratoires avec le solvant, revenant ainsi à l'état non excité et leur permettant de capturer plus d'espèces radicalaires. Les radicaux peroxy sont les seuls radicaux libres qui annihilent entièrement ces pigments : les caroténoïdes sont approximativement non réactifs, mais ils peuvent également se décomposer et créer des composés non radicalaires capables de mettre fin aux attaques des radicaux libres en se liant à ces radicaux (Paiva et Russell, 1999).

### 2.3 Méthode d'évaluation des antioxydants

L'activité antioxydante représente la capacité d'inhiber le processus d'oxydation et la plupart des antioxydants, endogènes ou exogènes, ont la capacité de piéger les radicaux libres. Sur la base du mode d'action, les évaluation des antioxydants peuvent être classés en deux méthodes principales; transfert d'atome d'hydrogène (TAH) ou transfert d'électron (TE) (Apak *et al.*, 2016). Les analyses à base de TAH (Fig. 2.10) mesurent la capacité d'un antioxydant à piéger les radicaux libres (généralement, le radical peroxy considéré comme étant biologiquement plus pertinent) par le don d'atomes H.

La réaction TAH est un mouvement d'un proton et d'un électron en une seule étape cinétique, comme illustré à la **figure 2.10**. Dans les mécanismes TAH, le radical libre élimine un atome d'hydrogène de l'antioxydant, lequel devient lui-même un radical.

Dans ce mécanisme, l'enthalpie de dissociation des liaisons (EDL) est un paramètre important dans l'évaluation de l'action antioxydante (Liang et Kitts, 2014). Plus le EDL du groupe donneur de H est bas dans le potentiel antioxydant, plus il sera facile pour la réaction d'inactivation des radicaux libres.



**Figure 2.10 Mécanismes d'un antioxydant réagissant avec les radicaux libres.** Par deux méthode : transfert d'électrons simples (TE) et transfert d'atomes d'hydrogène (TAH). Les espèces A· et BH désignent les radicaux libres et les antioxydants, respectivement. Dans le mécanisme TE, PI (potentiel d'ionisation) de l'antioxydant est le facteur énergétique le plus important dans l'évaluation de l'action antioxydante. Dans le mécanisme TAH, la EDL (enthalpie de dissociation des liaisons) de l'antioxydant est le paramètre important dans l'évaluation de l'action antioxydante. D'après (Liang et Kitts, 2014).

Les analyses à base de TAH mesurent la capacité d'un antioxydant à neutraliser les radicaux libres par le don d'hydrogène (H) pour former des composés stables (Prior *et al.*, 2005). La réactivité relative dans les essais TAH est déterminée par l'énergie de

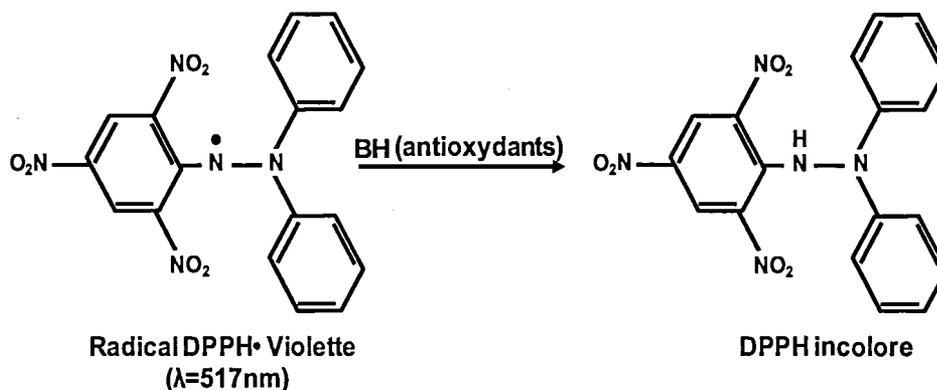
dissociation des liaisons hydrogène du groupe donneur de H dans l'antioxydant potentiel et le potentiel d'ionisation (Prior *et al.*, 2005).

Ces types de tests sont généralement composés d'un antioxydant (BH) et d'un générateur de radicaux libres synthétiques ( $X\bullet$ ) comme les radicaux ABTS $\bullet$  (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) (Konan *et al.*, 2016) ou le radical libre DPPH $\bullet$  (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) qui est recommandé pour des composés contenant des groupes -SH, -NH-et -OH (Amarowicz *et al.*, 2004). Dans les mécanismes TE, l'antioxydant fournit un électron au radical libre et devient lui-même un cation radicalaire (Miller *et al.*, 1993).

Les tests spectrophotométriques basés sur le TE mesurent la capacité d'un antioxydant à réduire un oxydant (probe ou sonde) et changer la couleur. Le changement de couleur (augmentation ou diminution de l'absorbance de la sonde à une longueur d'onde donnée) est corrélé à la concentration en antioxydants de l'échantillon. Plusieurs tests sont basés sur ce principe, par exemple la teneur totale en composés phénoliques (FRAP), le pouvoir de réduction des ions ferriques (Benzie et Strain, 1996), dosage de réduction de cuivre (CUPRAC), la capacité antioxydante équivalente de Trolox (TEAC) et le test colorimétrique avec le N,N-diéthyl-p-phénylènediamine (DPD). Il est très difficile de distinguer les réactions de la THA et de la SET (Mader *et al.*, 2007). Dans la plupart des situations, ces deux réactions ont lieu simultanément et le mécanisme de la réaction est déterminé par la structure et la solubilité de l'antioxydant, le coefficient de partage et la polarité du solvant (Huang *et al.*, 2005).

### 2.3.1 Le DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle)

La molécule du 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (ou  $\alpha,\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyle), ou **DPPH**, se caractérise par un radical libre stabilisé par la délocalisation de l'électron libre sur la molécule dans son ensemble (Fig. 2.11).



**Figure 2.11** Principe de la méthode colorimétrique DPPH. En présence d'un substrat pouvant donner un atome d'hydrogène, le DPPH• est réduit et perd sa couleur violette.

Cette délocalisation empêche la DPPH de se dimériser, comme ce serait le cas pour la plupart des autres radicaux libres. La délocalisation de l'électron donne également naissance à la couleur violette foncée, caractérisée par une bande d'absorption dans une solution d'éthanol centrée autour de 517 nm. Lorsqu'une solution de DPPH est mélangée à celle d'un antioxydant pouvant donner un atome d'hydrogène (HAT), il en résulte une forme réduite avec perte de la couleur violette. Le mécanisme de piégeage du radical libre DPPH• se fait particulièrement en deux étapes : (i) une étape rapide consistant essentiellement en l'abstraction des atomes de H les plus labiles de l'antioxydant; et (ii) une étape lente reflétant une activité restante sur les produits d'oxydation/dégradation dérivés de la première étape (Mishra *et al.*, 2012; Zou *et al.*, 2016).

### 2.3.2 La DPD (N, N-Diéthyl-p-phénylènediamine)

Dans la méthode colorimétrique DPD (N, N-Diéthyl-p-phénylènediamine), l'électrolyse du tampon KH peut générer des radicaux libres d'oxygène (RLO) tels que l'anion superoxyde ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) et le radical hydroxyle ( $\bullet\text{OH}$ ) et leurs sous-produits : peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et l'ion hypochlorite  $\text{OCl}^-$  (Jackson

*et al.*, 1986). Les EROs mesurées par ce test sont le  $\text{H}_2\text{O}_2$  et l'ion  $\text{OCl}^-$ , et car les RLOs sont très instables et ils sont générés peuvent être quantifiés à partir de la réaction d'oxydation de DPD (Fig. 2.12). La forme oxydée de DPD présente une couleur magenta absorbant à 515 nm. En présence d'un antioxydant, l'oxydation du chromogène n'est pas possible, ce qui entraîne la décoloration de la solution.

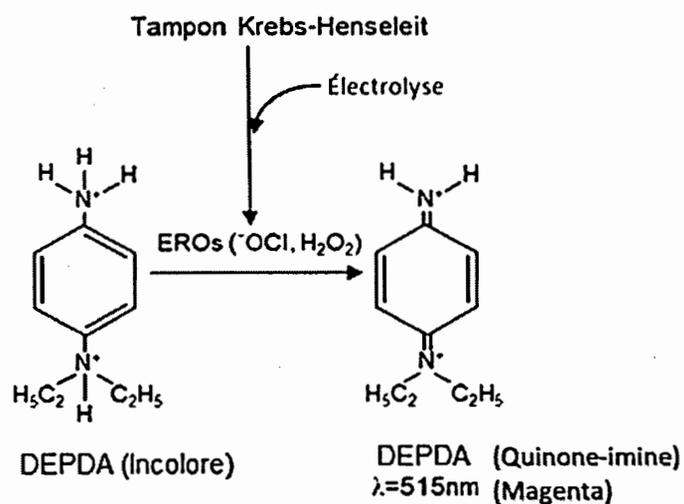


Figure 2.12      Principe de la méthode colorimétrique DPD

## CHAPITRE III

### BIOMATÉRIAUX POUR DES APPLICATIONS MÉDICALES

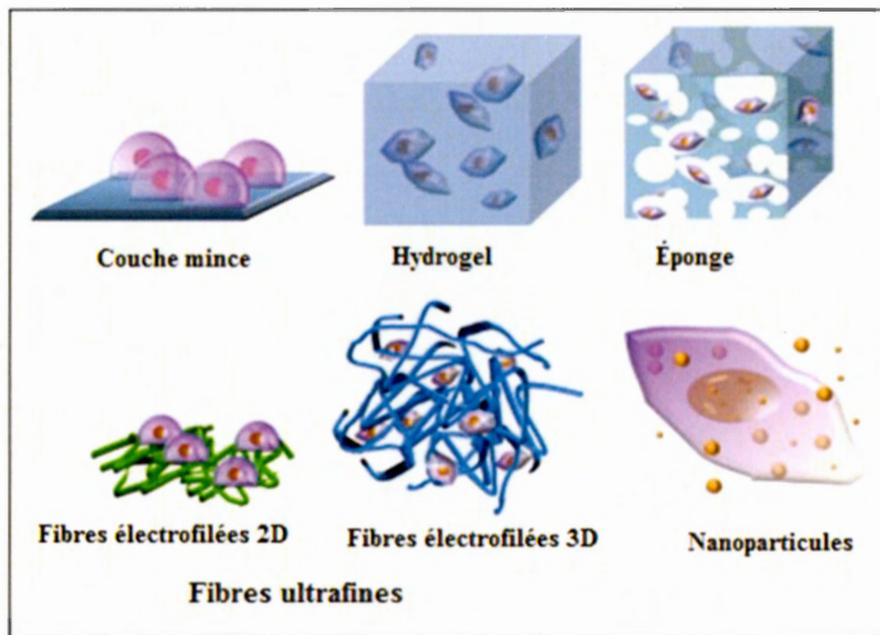
De nombreux composés actifs possèdent avec des propriétés thérapeutiques sont utilisés en médecine. Cependant, certaines caractéristiques, comme la faible biodisponibilité, le temps et la qualité nécessaires pour atteindre le site ciblé et les récepteurs situés dans le tissu cible, expliquent la faible activité de plusieurs de ces composés. Certains biomatériaux bien connus sont basés sur des polysaccharides comprenant le chitosane, l'amidon, la cellulose et le dextran. Ces polymères se trouvent naturellement dans différents groupes d'animaux et de plantes. Ils sont des bons matériaux pour les chercheurs qui souhaitent utiliser les biomatériaux pour des applications biotechnologiques et biomédicales. Il est supposé que leur combinaison avec certains polymères synthétiques comme le PVA améliore leurs propriétés mécaniques (Cascone *et al.* 1999).

#### 3.1 Concept de biomatériaux

Les études en sciences médicales ont fourni de nombreux biomatériaux qui peuvent accomplir, augmenter ou remplacer des certains tissus défectueux, en interagissant avec le système biologique. Ces matériaux représentent une classe unique de matériaux fonctionnels biomédicaux pouvant exercer une vaste gamme d'activités

biologiques en l'absence du tissu vivant original (**Fig. 3.1**). Ils remplacent ainsi les problèmes rencontrés avec le tissu défectueux et favorisent le bon fonctionnement de l'organisme vivant (Niaounakis, 2014).

La définition la plus acceptable des biomatériaux est actuellement celle utilisée par National Institutes of Health (NIH) qui décrit un biomatériau comme « toute substance ou combinaison de substances, autres que des médicaments, synthétiques ou d'origine naturelle, pouvant être utilisés pendant une période donnée, qui augmente ou remplace partiellement ou totalement un tissu, un organe ou une fonction du corps, afin de maintenir ou d'améliorer la qualité de la vie de l'individu » (Mitchell et Schoen, 2013).



**Figure 3.1** Différents types de biomatériaux. d'après (Holzapfel *et al.*, 2013).

Les premiers biomatériaux utilisés par les Egyptiens et les Romains ont été l'or et l'ivoire pour le remplacement des défauts crâniens. Le celluloïde (une matière

composée de nitrate de cellulose et de camphre) a été le premier plastique synthétique et l'un des premiers polymères acceptés après la Seconde Guerre mondiale (Niaounakis, 2014). Les biomatériaux sont un domaine multidisciplinaire qui englobe différentes compétences telles que l'ingénierie, la médecine, la dentisterie, la physique, la chimie et le design (Agarwal et Garcia, 2015; Maliaritsi *et al.*, 2006; Parida *et al.*, 2012). L'utilisation des implants médicaux a augmenté au cours des dernières décennies en raison du vieillissement de la population, de la modification du style de vie et des améliorations apportées à la technologie des implants (Saini *et al.*, 2015). Les biomatériaux peuvent être modifiés pour s'adapter à diverses applications dans de nombreuses parties du corps humain. Toutefois, pour chacune de ces applications, il est nécessaire de connaître le degré de tolérance de ces biomatériaux au contact d'organes et de tissus (Helary et Desimone, 2015; Tabata, 2009).

En ce qui concerne la réponse de l'organisme, les biomatériaux peuvent être caractérisés comme étant biocompatibles, biotolérables, bioinertes, bioactifs, biodégradables et en outre dotés de propriétés physiques et chimiques élevées (Holzapfel *et al.*, 2013).

La biocompatibilité est l'exigence de base pour tous les biomatériaux. Un biomatériau efficace doit être : non toxique, non immunogène, non thrombogène, non cancérigène, etc. La surface du biomatériau, directement exposée à l'organisme vivant, joue un rôle crucial. Le concept de biocompatibilité a été profondément modifié ces dernières années. Au début, certains pensaient qu'un matériau était biocompatible en étant complètement inerte vis-à-vis du corps humain, sans aucune réaction du milieu biologique à sa présence. Aujourd'hui, la biocompatibilité est mieux définie; elle repose essentiellement sur des phénomènes de surface, représentés par des interactions cellule-cellule, cellule-matériau et matériau (polymère) -protéine.

Les matériaux biodégradables se dégradent, se solubilisent ou sont absorbés au contact du corps pendant un certain temps. Leur application est très intéressante car il n'est pas

nécessaire de procéder à une nouvelle intervention chirurgicale pour retirer l'implant. Dans cette classe, les plus importants sont les biopolymères (Lee *et al.*, 2001).

Les propriétés physiques du biomatériau sont importantes pour la réponse de l'adhésion cellulaire. Lorsque des cellules adhèrent à la surface d'un biomatériau, des réactions physico-chimiques peuvent se produire entre cellule et biomatériau, ces réactions étant influencées par des facteurs tels que le comportement cellulaire, les propriétés de surface du biomatériau et les facteurs environnementaux. Les propriétés de surface des biomatériaux comprennent la mouillabilité, la charge, la rugosité et la composition chimique (Asghari *et al.*, 2017; Banyard *et al.*, 2015).

### 3.2 Les polymères intelligents, '*smart polymers*'

Les systèmes polymères sensibles ou « intelligents » sont des polymères qui répondent à différents stimuli ou changements de l'environnement. Les polymères intelligents sont souvent biocompatibles et capables de générer des réseaux, forts, flexibles, faciles à modifier et à colorer. Comme transporteurs ils peuvent préserver la stabilité du médicament transporté et ils peuvent également porter de nutriments pour les cellules. Pour ceux sensibles au changement de température il est possible de les injecter sous forme liquide pour créer un gel à la température corporelle (Galaev et Mattiason, 1999; Hoffmann et Stayton, 2004). Généralement, les systèmes les plus importants, y compris du point de vue biomédical, sont ceux sensibles au pH ou à la température. Le corps humain présente des variations de pH au long du tractus gastro-intestinal, et aussi dans certaines zones spécifiques comme certains tissus et zones tumorales. (Gil et Hudson, 2004; Jones, 2004).

Les polymères intelligents peuvent être classés en fonction de leurs caractéristiques physiques ou des stimuli auxquels ils répondent. Les polymères intelligents peuvent être classés en trois groupes : (i) sensibles à des stimulants physiques (température, ultrasons, lumière, stress mécanique); (ii) sensibles à des stimulants chimiques (pH et

force ionique) et (iii) sensibles à des stimulants biologiques, enzymes et biomolécules (Colson et Grinstaff, 2012; Hester *et al.*, 2002; Ward et Georgiou, 2011).

Ces polymères contiennent dans leur structure des groupes acides (carboxyliques ou sulfoniques) ou basiques (comme les amines) (Park et Bae, 1999; Samer *et al.*, 2001). Les polymères sensibles au pH sont des polyélectrolytes ayant dans leur structure des groupes acides ou basiques capables d'accepter ou de libérer des protons en réponse aux changements de pH dans le milieu environnant (Nagasaki *et al.*, 2001).

Le chitosane est un biopolymère polycationique soluble dans une solution acide et subit une séparation de phase dans une plage de pH proche de la neutralité par déprotonation du groupe amino primaire par des ions inorganiques (Al-Tahami et Singh, 2007). Le mécanisme de gélification du chitosane se produit par des interactions qui impliquent une attraction électrostatique entre le groupe amine du chitosane et un ion inorganique du milieu environnant (Priya James *et al.*, 2014). La résistance structurale d'un polymère peut être améliorée soit par mélange avec d'autres polymères, soit par modification hydrophobe du polymère. Par exemple, un composite de chitosane et d'alcool polyvinylique réticulé forme un réseau polymère semi- interpénétré qui se gélifie *in situ* à pH physiologique (Al-Tahami et Singh, 2007).

### 3.3 Les hydrogels

Le terme hydrogel est utilisé si le solvant retenu est de l'eau. Les hydrogels sont des réseaux hydrophiles de polymères capables de gonfler en présence d'eau, et de l'absorber une grande partie (jusqu'à 3000 fois sa masse) (Lee et Mooney, 2001). La capacité d'un l'hydrogel à absorber l'eau et d'autres liquides biologiques est due à la présence de groupes hydrophiles tels que -OH, -CONH<sub>2</sub>, -COOH et -SO<sub>3</sub>H (Larraneta *et al.*, 2018). Les hydrogels peuvent être de nature neutre ou ionique. Dans les hydrogels neutres, la force motrice du gonflement provient de la contribution thermodynamique du mélange eau-polymère à l'énergie libre globale qui est couplée à une contribution du polymère élastique (Omidian et Park, 2010). Dans les hydrogels

ioniques, le processus de gonflement est dû aux deux contributions précédentes ainsi qu'aux interactions ioniques entre le polymère chargé et les ions libres (Kashyap *et al.*, 2005). L'ionisation des groupes tels que les groupes carboxyl ou amine rend le polymère plus hydrophile et conduit ainsi à une absorption d'eau très élevée.

### 3.4 L'alcool polyvinylique

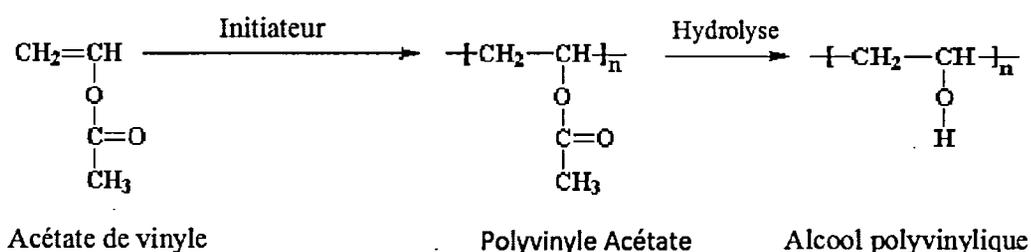
L'alcool polyvinylique (PVA) est un polymère hydrophile dont les propriétés favorables en ont fait un candidat idéal pour la technologie des biomatériaux. En fait, la biocompatibilité, la facilité de mise en forme et les propriétés adhésives sont à l'origine de sa grande qualité (Millon *et al.*, 2006). Ces caractéristiques physiques le rendent favorable pour les approches biomédicales.

#### 3.4.1 Synthèse et propriétés chimiques

L'alcool polyvinylique (PVA) a un réseau chimique assez simple avec des groupes hydroxyle pendants. Le monomère ne peut pas être trouvé sous forme stable. Par conséquent, il ne peut pas être produit directement. Le PVA est obtenu par polymérisation radicalaire d'acétate de vinyle en poly (acétate de vinyle, PVAc) suivie de l'hydrolyse de PVAc en PVA. Le processus est basé sur l'hydrolyse partielle des groupes ester dans le PVAc pour générer le groupe hydroxyle et est complété en présence d'hydroxyde de sodium aqueux. Après l'addition progressive de l'agent de saponification aqueux, le PVA est précipité, lavé et séché. Le degré d'hydrolyse est déterminé par le moment auquel la réaction de saponification est arrêtée (Chiellini *et al.*, 1999; Chiellini *et al.*, 2003; Qiu et Netravali, 2012; Solaro *et al.*, 2000). Puisque la réaction d'hydrolyse n'est pas complète, le PVA est toujours un copolymère de PVA et de PVAc. La **figure 3.2** montre la réaction chimique de production de PVA.

Le degré d'hydrolyse, qui est un indicateur de la présence de groupes acétate dans le polymère, affecte les propriétés du polymère. Il a été rapporté que le PVA présentant un degré d'hydrolyse élevé (supérieur à 95 %) a une faible solubilité dans l'eau.

L'alcool polyvinylique a d'excellentes propriétés filmogènes, émulsifiantes et adhésives. Il présente une résistance à la traction et une flexibilité élevées, ainsi qu'une barrière élevée contre l'oxygène et les arômes. Cependant, ces propriétés dépendent de l'humidité, en d'autres termes, une humidité plus grande permettra au PVA d'absorber plus d'eau. L'eau, qui agit comme un plastifiant, réduira alors sa résistance à la traction, mais augmentera son allongement et sa résistance à la déchirure (Pal *et al.*, 2007).



**Figure 3.2** La production de PVA.

Tous les types de PVA sont solubles dans l'eau et dépendent de facteurs tels que la degré d'hydrolyse, la masse moléculaire, la cristallinité des particules et la distribution granulométrique. En tant que polymère hydrophile, le PVA présente d'excellentes propriétés de rétention d'eau (Gaaz *et al.*, 2015). La distribution de la masse moléculaire est une caractéristique importante du PVA car elle affecte de nombreuses propriétés telles que la cristallisabilité, l'adhérence, la résistance mécanique et la diffusivité (Finch, 1992). Le PVA est partiellement cristallin lors de sa formation et se caractérise par des propriétés telles que la résistance chimique, l'hydrosolubilité et la biodégradabilité. La similitude des certaines propriétés physiques le rend compatible avec les tissus humains (Lozinsky et Plieva, 1998). Ce polymère est largement utilisé en mélange avec d'autres polymères ayant des propriétés hydrophiles; il est utilisé dans

diverses applications industrielles pour améliorer les propriétés mécaniques des films en raison de sa structure compatible et de ses propriétés hydrophiles (Peppas et Merrill, 1977). En raison de la nature hydrophile du PVA, il faut des ponts de réticulation pour préparer les hydrogels pour de nombreuses applications (Pal *et al.*, 2007).

#### 3.4.2 Méthodes de réticulation pour la préparation d'hydrogels

Peppas et Merrill ont proposé les hydrogels de PVA comme des biomatériaux dans les domaines pharmaceutique et biomédical car il est hydrophile et lorsque réticulé, il forme un réseau polymère de PVA qui gonfle au contact de l'eau ou des fluides biologiques (Peppas et Merrill, 1977). Pour préparer l'hydrogel, le PVA doit être réticulé par l'une des méthodes mentionnées dans la prochaine section, en fonction de son utilisation. Le gel de polymère est un réseau flexible de chaînes réticulées. Il existe deux mécanismes différents de gélification : la réticulation covalente et la réticulation physique (Parida *et al.*, 2012; Wan *et al.*, 2002). La réticulation covalente (gel «permanent») est une bonne méthode pour contrôler la densité de réticulation (Chen *et al.*, 1973). Cependant, la formation de réticulation non dégradable et la toxicité de l'agent de réticulation doivent être prises en compte (Lozinsky et Plieva, 1998). Des gels «physiques» ou «réversibles» se forment lorsque le réseau est maintenu par enchevêtrement ou par des forces faibles telles que des liaisons H ou hydrophobes, des forces van der Waals, ou interactions ioniques (Lee et Mooney, 2001). Bien que la réticulation ionique soit un moyen simple de former des gels, des ions pourraient s'échanger avec d'autres ions en milieu aqueux et affaiblir les propriétés originales du gel (Gordon, 1999). Toutes ces interactions dans les gels physiques peuvent être perturbées par les changements de conditions physiques (force ionique, pH, température et application de stress), alors que les gels chimiques sont stables (Lee et Mooney, 2001). Les gels physiques ne sont pas homogènes en raison de la formation de grappes d'enchevêtrement moléculaire et contiennent des régions à faible gonflement dans l'eau et à haute densité de réticulation (Peppas et Merrill, 1977). La

figure 3.3 montre schématiquement la différence entre un hydrogel physique et une autre chimique.

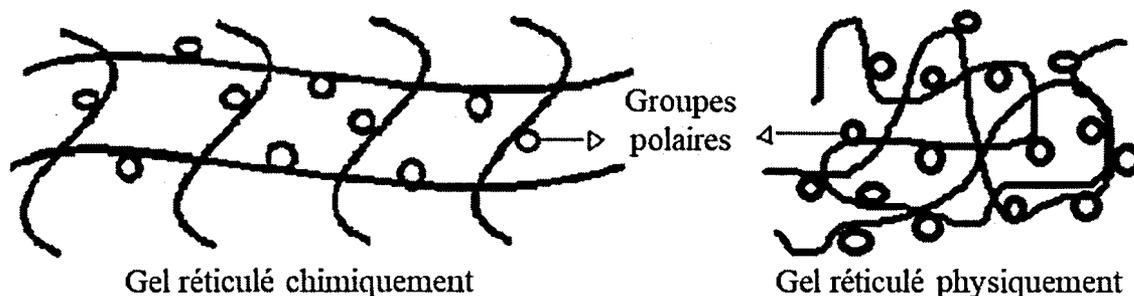


Figure 3.3 Hydrogels synthétisés chimiquement et physiquement.

En fonction du degré de réticulation chimique ou physique, la quantité d'eau absorbée varie. Il y a des hydrogels à gonflement faible, moyen et élevé. Les hydrogels de PVA, en raison de leur susceptibilité de former des liaisons hydrogène et à leur cristallisation excessive, offrent généralement une très faible capacité de gonflement, ce qui est toutefois souhaitables pour des applications biomédicales et pharmaceutiques spécifiques.

#### 3.4.3 Méthodes de réticulation chimique

Il existe plusieurs agents chimiques utilisés pour la réticulation du PVA, tels que le trimétaphosphate de sodium (STMP), l'épichlorhydrine, le glutaraldéhyde, l'acétaldéhyde, le formaldéhyde et d'autres monoaldéhydes. Les agents de réticulation courants tels que le formaldéhyde et le glutaraldéhyde doivent être en présence d'acide sulfurique, d'acide acétique ou de méthanol pour former les ponts acétals entre les groupes hydroxyles pendant des chaînes de PVA.

Cependant, certains d'entre eux (aldéhyde) sont toxiques et la quantité d'agent de réticulation résiduelle restant dans le polymère final, ainsi que les moyens d'atteindre une concentration acceptable et sécuritaire peuvent être assez difficiles (Figueiredo *et al.*, 2009). La forme des hydrogels chimiquement réticulés ne change pas sous la pression ordinaire et les mouvements irréguliers ne cassent pas les hydrogels utilisés comme systèmes de transport de médicament. Par conséquent, un tel système stable pourrait être efficace dans la délivrance de divers agents à un site spécifique.

#### 3.4.4 L'irradiation

Afin de résoudre les complications associées à l'utilisation d'agents de réticulation chimiques, les méthodes physiques sont préférées car les polymères de PVA ont la fonctionnalité souhaitable pour la réticulation physique par irradiation ou congélation-décongélation, ainsi que la gélification ionotrope. Les hydrogels produits par irradiation offrent de meilleures propriétés de libération de médicaments que les hydrogels réticulés par la chaleur (Kenawy *et al.*, 2014); ils peuvent toutefois présenter de faibles propriétés mécaniques (Hennink et van Nostrum, 2002; Stauffer et Peppast, 1992).

#### 3.5 Association de l'alcool polyvinylique avec d'autres polymères pour améliorer des applications médicales

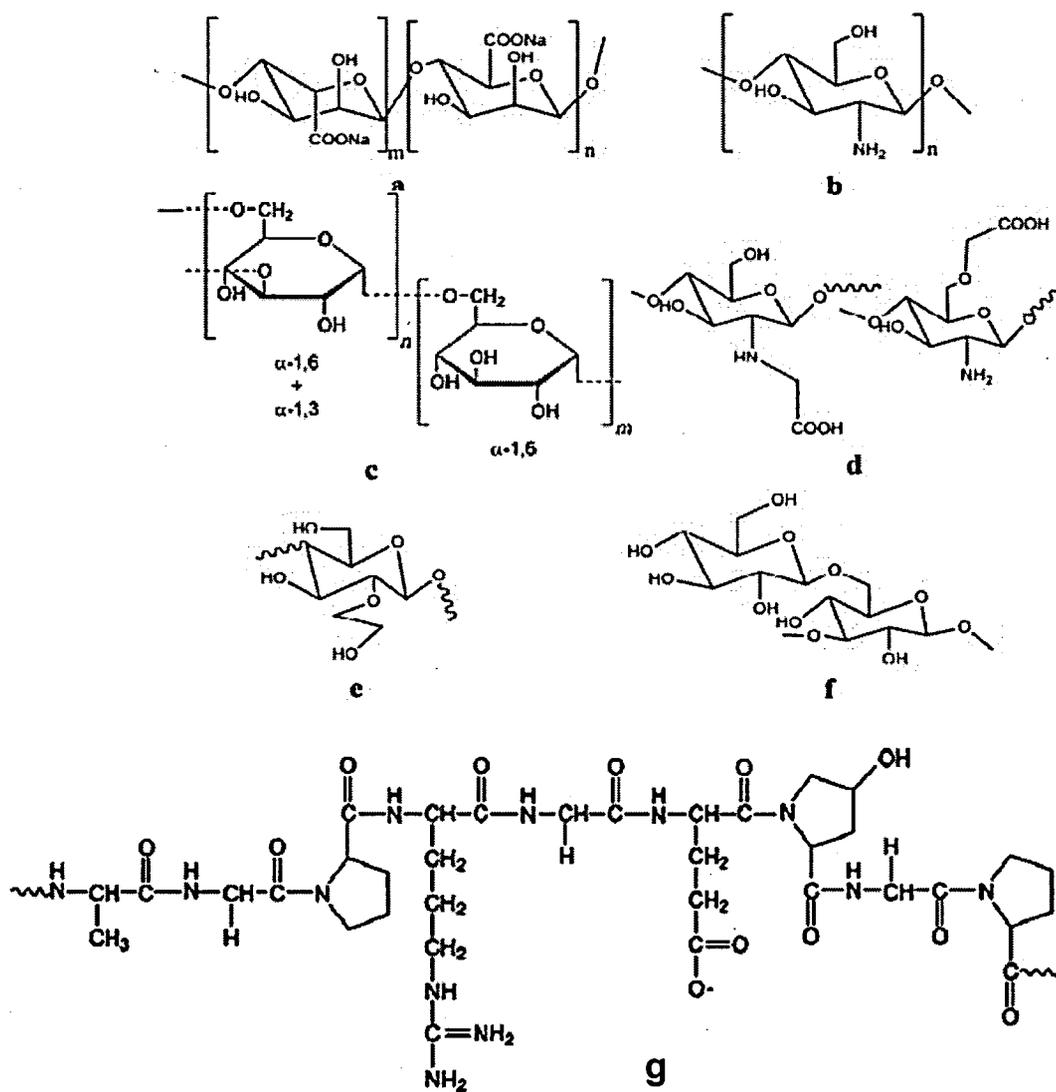
Afin d'évaluer, d'adapter et d'améliorer diverses fonctions naturelle, plusieurs groupes de recherche ont étudié la possibilité de cibler le matériau, ce qui permettrait d'optimiser l'interface avec les systèmes biologiques (Chuang *et al.*, 1999). Actuellement, les membranes d'hydrogel biodégradables ont été appliquées de manière intensive sur le marché médical, en raison de leur biocompatibilité (Abraham *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 1996; Tripathi *et al.*, 2010). Au cours des dernières décennies, les besoins en polysaccharides ont considérablement augmenté, en particulier dans les applications biomédicales. Des polysaccharides, tels que l'alginate, le chitosane, le

dextran et l'amidon sont des polymères biologiques pouvant être obtenus à partir de plusieurs sources naturelles (**Tableau 3.1** et **Fig. 3.4**).

Le PVA, en raison de ses propriétés biocompatibles, biologiquement solubles, biodégradables, non cancérogènes, solubles dans l'eau et de ses excellentes propriétés filmogènes, a déjà été mélangé à des polymères synthétiques et naturels. Des matériaux, soit des polymères naturels ou synthétiques, sont souvent mélangés avec du PVA pour améliorer les propriétés mécaniques et physico-chimiques (Lee *et al.*, 1996). Les matériaux mélangés sont appelés composites et sont largement utilisés dans différents domaines scientifiques. Un matériau composite est fabriqué en combinant deux matériaux ou plus et des caractéristiques mécaniques et physico-chimiques pour une application particulière peuvent être obtenues. Les matériaux composites ont été largement utilisés dans différents domaines, par exemple : pansements (Kenawy *et al.*, 2014), traitements des plaies (Zhao *et al.*, 2003), systèmes d'administration de médicaments (Muggli *et al.*, 1999), organes artificiels (Yang *et al.*, 2008) et lentilles de contact (Hyon *et al.*, 1994).

**Tableau 3.1 Différents polymères pouvant être associés avec l'alcool polyvinylique.**

<b>Polymères</b>	<b>Propriétés</b>
Alginate (Fig 3.4a)	Polymère hydrosoluble, biocompatible et biodégradable, adapté à l'injection <i>in situ</i> , réticulation possible en conditions douces. A une faiblesse mécanique, des difficultés de manipulation, doit être gardé en solution et stérilisé (Levi <i>et al.</i> , 2011).
Chitosane (Fig 3.4b)	Excellente biocompatibilité et bonne réponse de l'hôte, biodégradabilité unique par le lysozyme et des enzymes, activité antimicrobienne élevée, surface hydrophile facilitant l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire. A aussi une faiblesse mécanique, solution de polymère très visqueuse et polymère soluble dans l'eau uniquement en milieu acide, coûts des purification additionnels (Tripathi <i>et al.</i> 2010).
Amidon (Fig 3.4d)	Solubilité modulable, peu coûteux, biodégradable <i>in vivo</i> par l'amylase, biocompatible, facile à modifier avec un autre polymère. Par contre il y a difficultés de réticulation, faiblesse mécanique et besoin de modification pour améliorer l'adhésion cellulaire (Zhao <i>et al.</i> , 2003).
Gélatine (Fig 3.4f)	Hydrosoluble, obtenue à partir de divers sous-produits animaux, largement répandus dans les applications biomédicales, faciles à former des films et hydrogels matriciels. Par contre : solution de polymère très visqueuse, biodégradation très rapide (Hwang <i>et al.</i> , 2010).
Dextran	Soluble dans l'eau, biodégradable <i>in vivo</i> par dextranase, biocompatible, bonne prolifération et comportement de différenciation. Par contre : polymère coûteux, faiblesse mécanique et besoin de modification pour améliorer l'adhésion cellulaire (Cascone <i>et al.</i> , 1999).



**Figure 3.4** Structures chimiques de polymères naturels, et de leurs dérivés qui ont été mélangés avec de l'hydrogel de PVA pour former des pansements, tels que l'alginate de sodium (a), le chitosane (b), le dextran (c), le carboxyméthylchitosane (d), l'hydroxyéthyle amidon, HES Allemagne et (1,3),(1,6)-β-glucane (f), gélatine (g), d'après (Elzoghby, 2013; Kamoun *et al.*, 2015).

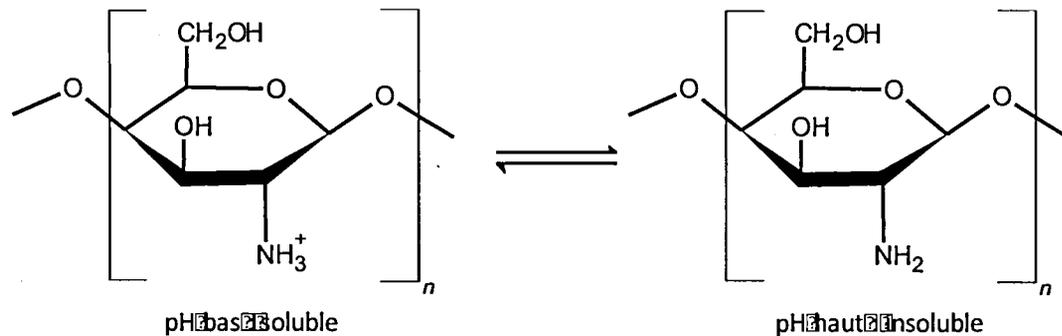
### 3.6 Le chitosane

Le chitosane est un polysaccharide copolymère linéaire cationique constitué d'une distribution aléatoire de 2-amino-2-désoxy-D-glucose (D-glucosamine) et de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose (N-acétyl-D-glucosamine). Le chitosane est généralement obtenu par une désacétylation poussée de la chitine, un polysaccharide abondant présent dans les carapaces de crustacés (Felt *et al.*, 1998). La chitine est un hétéropolysaccharide binaire et non ramifié composé d'unités N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine liées par des liaisons glycosidiques  $\beta$  (1-4), où les unités N-acétyl-D-glucosamine sont prédominantes dans la chaîne. La chitine est le deuxième biopolymère le plus abondant après la cellulose dans la nature (Rinaudo, 2006).

Le processus de désacétylation pour la synthèse du chitosane à partir de la chitine est généralement effectué par hydrolyse dans des conditions alcalines à haute température (environ 100 °C) en présence d'une solution concentrée de NaOH ou de KOH (environ 45 %). La méthode de préparation comporte quatre étapes, *i.e.* déprotéinisation, déminéralisation, décoloration et désacétylation (Dutta *et al.*, 2004).

La structure moléculaire, le polymorphisme, le degré de désacétylation (**DDA**) et la masse moléculaire ont un effet majeur sur les propriétés du chitosane, de sorte qu'il est possible de moduler l'hydrophilicité, la solubilité et la vulnérabilité à la dégradation par les enzymes (Yogeshkumar *et al.*, 2013).

La polyvalence du chitosane est due au fait que les groupes amine jouent le rôle de site réactif pour une variété de nouvelles réactions utilisant des conditions douces, ainsi qu'au caractère cationique du chitosane qui est également attribué aux groupes amine et appelé amino polysaccharide. À faible pH, le chitosane reste une espèce polycationique, en raison de la protonation du groupe amine qui a une solubilité accrue (Fig. 3.5).



**Figure 3.5** Structure du chitosane à différents pH. refaire

De plus, la caractère cationique du chitosane peut être inversé via la sulfonation pour introduire un caractère anionique, donnant une meilleure solubilité dans l'eau et des propriétés anticoagulantes (Yogeshkumar *et al.*, 2013). Selon la procédure de préparation et la source de chitosane, la masse moléculaire (MW) peut varier de 300 à plus de 1000 kDa avec un degré de désacétylation de 30 % à 95 % (Ali et Ahmed, 2018).

### 3.6.1 Propriétés et applications

Le chitosane est un polymère cationique d'origine naturelle aux propriétés multifonctionnelles contenant des unités de glucosamine qui a des densités de charge positives élevées. Il est biocompatible, biodégradable et mucoadhésif (He *et al.*, 1998; Henriksen *et al.*, 1996). Le chitosane provient de ressources renouvelables non toxiques et agit comme biomatériau compatible et efficace (Cho *et al.*, 1998). L'activité antimicrobienne et la faible immunogénicité du chitosane, ainsi que sa biocompatibilité et sa biodégradabilité, ont fourni des possibilités d'utilisation dans divers domaines, par exemple dans le secteur pharmaceutique ou dans l'administration de médicaments et biomédical, l'ingénierie tissulaire, l'administration de gènes, etc. Les groupes amine primaire dans le polymère de chitosane fournissent une charge positive sur sa surface. En raison de sa structure unique avec une surface polycationique et sa capacité à former

des liaisons H inter et intramoléculaires, le chitosane a été considéré comme un bon candidat pour le développement de nouveaux produits pharmaceutiques.

La solubilité du chitosane dépend de la structure cristalline du polymère et du DDA. En particulier, les liaisons hydrogènes intramoléculaires qui lient l'hydroxyle du carbone 3 d'une unité à l'oxygène d'une unité adjacente sont reflétées par la rigidité de la chaîne linéaire du polymère (Cho *et al.*, 1998). Le chitosane est soluble dans les acides inorganiques et organiques dilués à pH inférieur au pKa du chitosane (environ 6.3). À faible pH, les groupes amine libres sont protonés, provoquant une répulsion électrostatique entre les chaînes et permettant ainsi la solvataion du polymère. À un certain pH, qui dépend du DDA et de la masse moléculaire, les chaînes polymères en solution développent suffisamment de liaisons hydrogène pour former un gel (Matthew, 2002).

Au cours des deux dernières décennies, le chitosane et ses dérivés se sont révélés des candidats pour améliorer l'administration des médicaments vers les muqueuses ainsi que trans-muqueuses, principalement en raison de leurs propriétés mucoadhésives et l'absorption, étroitement liées au caractère cationique du polymère (He *et al.*, 1998; Henriksen *et al.*, 1996). En effet, en raison de sa charge positive, le chitosane présente la particularité d'adhérer aux surfaces des muqueuses. Le potentiel du chitosane pour la livraison de médicaments par voie trans-muqueuse a été renforcé par de nombreuses démonstrations de sa capacité, à la fois *in vitro* et *in vivo*, à élargir de manière transitoire les jonctions serrées entre les cellules épithéliales (niveau nasale, rein), facilitant ainsi le transport de macromolécules mal absorbables à travers l'épithélium (Krayukhina *et al.*, 2008).

La toxicité du chitosane dans des solutions de concentrations comprises entre 0.003 et 0.025 % sur des cellules Calu-3 (le poumon) peut être considérablement réduite après la fonctionnalisation du chitosane avec les groupes méthoxy-polyéthylène glycol (Casettari *et al.*, 2012). Ce phénomène a été expliqué par l'encombrement stérique créé

par la fonctionnalisation, réduisant les interactions des groupes amine avec les membranes cellulaires. Presque tous les travaux concernant l'application du chitosane se réfèrent au polymère en tant que matériau biologiquement compatible non toxique, convenant donc à la fabrication de supports dans le domaine de la délivrance des médicaments.

Le chitosane en tant que biopolymère biodégradable naturel subit une transformation enzymatique en composantes basiques non toxiques. Le chitosane est dégradé *in vivo* par certains enzymes, telles que la chitinase, la chitosanase et par le lysozyme – une hydrolase non spécifique présente dans tous les tissus de mammifère – produisant des oligosaccharides non toxiques qui peuvent ensuite être excrétés ou incorporés dans des glycosaminoglycanes et des glycoprotéines (Muzzarelli *et al.*, 1987; Rodrigues *et al.*, 2012). Les chitinases et les chitosanases sont des enzymes qui peuvent être classées dans différentes familles de glycosides- hydrolases. Les chitosanases est capables de convertir la chitine et le chitosane en chitoooligosaccharides en hydrolysant le lien  $\beta(1-4)$  entre les unités de sucre (Rodrigues *et al.*, 2012).

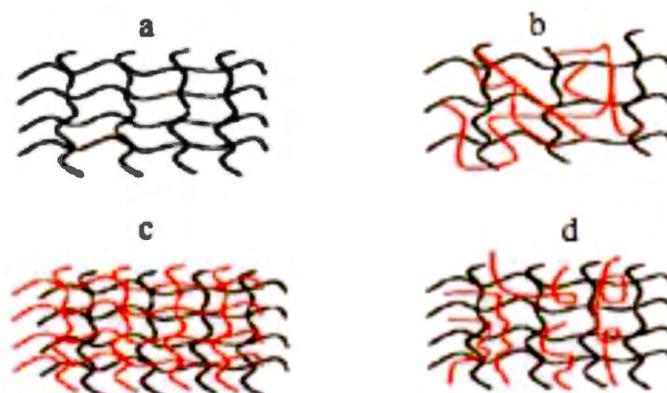
L'action de la chitosanase sur les liaisons glycosidiques conduit à la production de glucosamine et d'hétéroooligosaccharides constitués de glucosamine et de N-acétyl-D-glucosamine (Fukamizo *et al.*, 1994). La masse moléculaire, la polydispersité, le degré de désacétylation (DDA), le degré de pureté et la teneur en humidité jouent un rôle crucial dans la détermination du mécanisme et de la vitesse de dégradation du polymère. Les chitosanes de masse moléculaire élevée et de degré de désacétylation élevé possédaient une affinité inférieure pour l'enzyme et aussi une vitesse de dégradation plus lente (Fukamizo *et al.*, 1994).

### 3.6.2 Méthodes de réticulation

Il existe plusieurs méthodes de réticulation (physiques, chimiques) pour le chitosane ainsi que pour d'autres polymères (*i.e.* le PVA). Les méthodes de réticulation physiques possibles sont les rayons UV et les rayons gamma.

Toutes les méthodes physiques sont faciles à réaliser et bon marché. La réticulation par l'irradiation du polysaccharide a été décrite pour la première fois par Yoshii *et al.* (Yoshii *et al.*, 2003). Ils ont montré que des dérivés de polysaccharides solubles dans l'eau tels que la carboxyméthylcellulose (CMC), le carboxyméthylamidon (CMS), la carboxyméthylchitine (CMCT) et le carboxyméthylchitosane (CMCTS) se réticulent par irradiation dans une solution aqueuse à concentration élevée. Cependant, l'inconvénient de ces méthodes est la difficulté à contrôler le processus de réticulation pour obtenir le degré de réticulation souhaité (Ershov *et al.*, 1993; Mateescu *et al.*, 1994).

Les hydrogels de chitosane chimiquement réticulés se trouvent dans quatre types de structures. Le type le plus simple d'hydrogel de chitosane formé par la réticulation par covalence. Les autres types sont le réseau polymère hybride (la réticulation avec un autre polymère, dit 'hybride') et la réticulation ionique du chitosane (Fig. 3.6). Parmi des différents types de réticulation de chitosane, les hydrogels réticulés par covalence sont les seuls systèmes caractérisés par un réseau permanent, du fait de leurs liaisons chimiques irréversibles. Par conséquent, ils présentent de bonnes propriétés mécaniques. Les hydrogels de chitosane réticulés ioniquement présentent un gonflement plus important avec les changements de pH par rapport aux hydrogels de chitosane réticulés par covalence (Berger *et al.*, 2004).

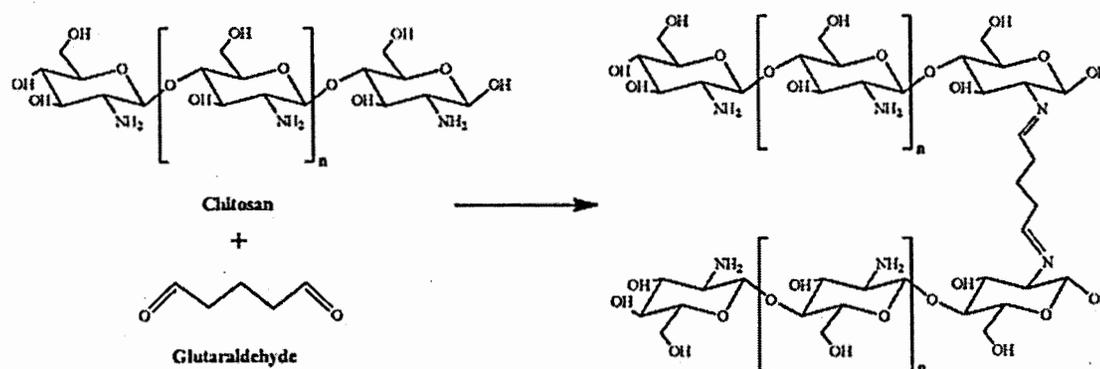


**Figure 3.6** Structure d'un hydrogel à base de chitosane préparé par réticulation covalente. Les hydrogels à base de chitosane comprennent, (a); uniquement des chaînons croisés de chitosane, (b); le chitosane est réticulé via un polymère différent, (c); le chitosane et un autre polymère sont enchevêtrés et chaque type de polymère est réticulé, (d); un autre polymère peut enchevêtrer le chitosane, où les macromères de chitosane sont réticulés. D'après (Berger *et al.*, 2004).

La méthode de réticulation chimique est la méthode la plus simple permettant de produire des réseaux permanents utilisant une liaison covalente ou ionique entre les chaînes polymères. Les groupes amine et hydroxyle disponibles sur le chitosane sont des sites capables de former une base de Schiff. Le réseau peut être formé en utilisant des agents de réticulation à petite molécule ou des réactions polymère-polymère entre des groupes fonctionnels activés.

Les méthodes de réticulation chimique sont basées sur le produit des réactions chimiques qui ont lieu après l'ajout de l'agent de réticulation au polymère. Plusieurs agents de réticulation chimiques peuvent être utilisés pour réticuler le chitosane, tels que le glutaraldéhyde (**Fig. 3.7**) (Gratzer *et al.*, 1996), le formaldéhyde, tripolyphosphate, l'éther diglycidyle et le diisocyanate (Józwiak *et al.*, 2017). Cependant, les réactifs de réticulation synthétiques sont tous plus ou moins

cytotoxiques et peuvent altérer la biocompatibilité d'un système d'administration de chitosane. Par conséquent, le développement d'un nouvel agent de réticulation naturel est nécessaire, et pour cette raison, la génipine est un bon candidat comme réactif naturel de réticulation (Jae Suk *et al.*, 2011; Somers *et al.*, 2008).



**Figure 3.7 Mécanisme de réticulation du chitosane avec glutaraldéhyde**

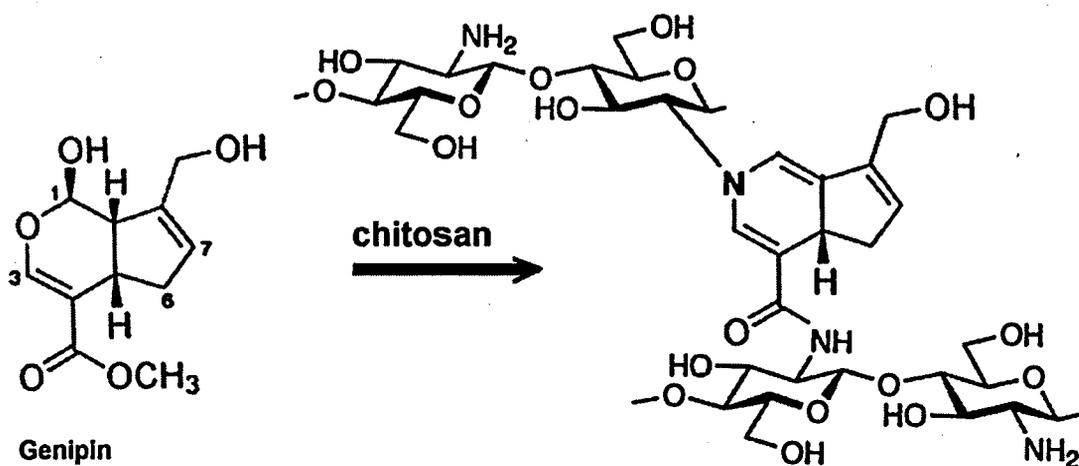
### 3.6.2.1 La génipine

Étant un composé d'origine naturelle, elle a été sélectionnée en raison de sa toxicité inférieure à celle de nombreux autres réactifs de réticulation synthétiques couramment utilisés. La génipine est un agent extrait du fruit de gardénia (*Gardenia jasminoides*). En médecine traditionnelle chinoise, elle a été utilisée pour traiter les patients atteints de jaunisse (Akao *et al.*, 1994). De nombreuses études ont montré que la génipine présentait un niveau de cytotoxicité bien inférieur à celui du glutaraldéhyde (Chang *et al.*, 2005).

La génipine a suscité de nombreux intérêts dans son isolement et sa purification pour une utilisation en thérapie et dans la fabrication de produits alimentaires (Wang *et al.*,

2012). La génipine est cholérétique (augmente le volume de la sécrétion de bile par la vésicule biliaire, ainsi que la quantité de solides sécrétée), antidépresseur, antidiabétique, anticancéreux, antithrombotique, anti-inflammatoire, antibactérienne, gastro, hépato et neuroprotecteur (Pal *et al.*, 2009); elle empêche la peroxydation lipidique et protège les neurones de l'hippocampe contre la protéine bêta-amyloïde d'Alzheimer (Huang *et al.*, 2018).

Les applications les plus importantes de la génipine en association avec le chitosane sont la préparation de substituts de cartilage élastique pour la libération contrôlée de médicaments (Pal *et al.*, 2009). La génipine, en tant qu'agent de réticulation bifonctionnel, réagit rapidement avec le chitosane (Fig 3.8) et aussi avec les protéines ou les acides aminés en général pour produire des hydrogels fluorescents teintés de bleu.



**Figure 3.8** Mécanisme de réticulation de chitosane avec la génipine. D'après (Qiujin, 2015).

La réaction la plus rapide à se produire est une attaque nucléophile de la génipine par un groupe amine primaire pour former un composé hétérocyclique de la génipine lié au résidu de glucosamine dans le chitosane. La seconde réaction, plus lente, est la substitution nucléophile du groupe ester que possède la génipine pour former une

liaison amide secondaire avec le chitosane. Les deux réactions se déroulent à des vitesses différentes et conduisent à la formation de liaisons transversales entre les groupes amines primaires (Akao *et al.*, 1994).

### 3.7 Les films médicamenteux comme vecteurs d'agents actifs

Un film mince est une matrice polymérique qui répond à de nombreuses exigences pour être utilisé (avec ou sans plastifiant) efficacement comme plate-forme de libération de médicaments (Borges *et al.*, 2015). Les films minces, par leur flexibilité, sont d'excellents candidats pour cibler certains des sites d'absorption (Prausnitz *et al.*, 2004).

Les films bioadhésifs polysaccharidiques naturels en tant que formes posologiques font l'objet d'une attention considérable dans l'industrie pharmaceutique; ce sont des produits nouveaux, adaptés au patient en raison de leur petite taille et de leur épaisseur (De Oliveira Fulgencio *et al.*, 2014; Hermans *et al.*, 2014). De plus, la facilité de fabrication, la méthode de préparation économique et la nature biocompatible de ces films ont favorisé leur applicabilité à la fois pour la livraison locale et systémique d'agents thérapeutiques.

Les films muco-adhésifs sont des formes posologiques absorbantes minces et flexibles, et libèrent le médicament directement dans un substrat biologique. Ils facilitent l'augmentation du temps de séjour au site d'application, entraînant des effets thérapeutiques prolongés (Tartara *et al.*, 2014). Les propriétés muco-adhésives sont de nature hydrophile; le film subit un gonflement et forme une interaction en chaîne avec la mucine (De Oliveira Fulgencio *et al.*, 2014). Parmi les nombreux polymères étudiés, le chitosane, l'hyaluronane, les dérivés de la cellulose, les polyacrylates, l'alginate, la gélatine (Fig. 3.4) et la pectine présentent les propriétés de mucoadhérence les plus convaincantes (Sudhakar *et al.*, 2006). Comparés aux polymères non-chargés, les polymères cationiques et anioniques facilitent une interaction forte avec le mucus (De Oliveira Fulgencio *et al.*, 2014). Les polymères anioniques sont bien caractérisés en

raison de l'existence de groupes fonctionnels carboxyle et sulfate. À titre d'exemple, la carboxyméthylcellulose sodique (NaCMC) et l'acide polyacrylique (PAA) présentent d'excellentes propriétés muco-adhésives en raison de la formation de liens avec la mucine (Karki *et al.*, 2016).

Les films minces doivent présenter des caractéristiques souhaitables telles qu'une capacité de charge en médicament suffisante, une vitesse de dissolution rapide ou un long temps de séjour sur le site d'administration (dépendement de l'endroit où ils sont utilisés) et une stabilité acceptable. Ils doivent également être non toxiques, biocompatibles et biodégradables (Tartara *et al.*, 2014). Les films minces sont considérés comme étant faciles à avaler et à dissolution rapide; ce qui en fait une plateforme polyvalente pour la livraison de médicaments. Les pellicules orales à dissolution rapide sont généralement des pellicules ultra-minces (50 à 150  $\mu\text{m}$ ) ayant la taille d'un timbre-poste, qui se dissolvent en une minute dans la cavité buccale après avoir été en contact avec la salive. Le système d'administration des films minces a été utilisé à la fois pour une action systémique et locale via plusieurs voies telles que la voie orale, buccale, sublinguale, oculaire et transdermique. Les médicaments à haute perméabilité aux muqueuses sont connus pour leur aptitude à l'administration par voie buccale et sublinguale avec des films (Karki *et al.*, 2016). Les médicaments chargés dans les films adhésifs buccaux sont absorbés directement via la muqueuse buccale, qui livre le médicament à la circulation systémique après leur absorption (Hao et Heng, 2003).

Le film mince se dissout rapidement par rapport aux autres formes de dosage conventionnelles (Sudhakar *et al.*, 2006). Les films minces sont moins friables et ont une forme facile à transporter par rapport aux comprimés à désintégration rapide par voie orale nécessitant un emballage spécial. De même, une seule dose peut être transportée individuellement sans nécessiter de contenant secondaire (Russo *et al.*, 2016), ce qui offre la possibilité de contrôler le moment, la durée et la posologie du

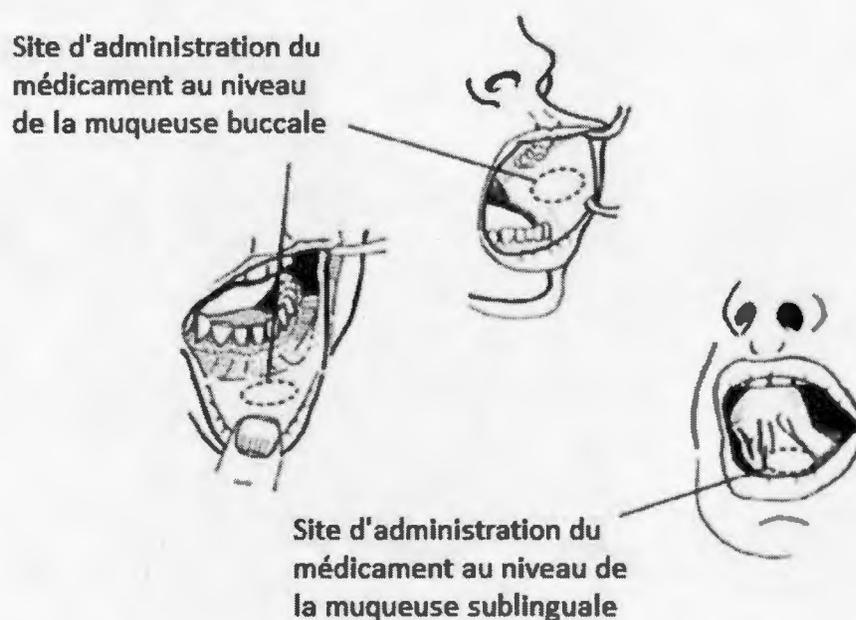
médicament en réponse à un traitement donné. En outre, les films ont la capacité de libérer le médicament à un endroit spécifique en exploitant la différence de propriétés environnementales sur le site de la maladie et la capacité de minimiser la libération de médicament lorsque le déclencheur est désactivé. Les patients manifestent une préférence pour les couches minces en raison de sa forme et la facilité d'administration (Karki *et al.*, 2016).

La principale limitation des films minces est, liée à la faible capacité de chargement d'un médicament administré à forte dose (Wening et Breitzkreutz, 2011). Combiner simultanément plusieurs médicaments est aussi une tâche difficile dans la formulation de film pour administration par voie orale parce que cela peut entraver leur dissolution et leur désintégration (Deepak *et al.*, 2015).

Les études sur des films polymères ont permis d'améliorer la biodisponibilité du médicament et l'adhésion du patient au traitement médicamenteux par voie orale, notamment buccale et sublinguale (Hao et Heng, 2003). Les caractéristiques anatomiques et physiologiques de la muqueuse buccale, telles que l'existence de muscles lisses à haute densité vasculaire, l'accessibilité facile et la dérivation du métabolisme de premier passage en font une voie favorable pour la délivrance du médicament (Karki *et al.*, 2016). La voie oculaire est un autre moyen d'administration des couches minces. L'installation topique est la voie d'administration non invasive la plus privilégiée pour traiter les maladies du segment antérieur, comme la conjonctivite, le glaucome et les syndromes chroniques de sécheresse oculaire. Les formes galéniques classiques telles que les gouttes pour les yeux représentent 90 % des formulations ophtalmiques commercialisées. Cela peut être attribuée à la facilité d'administration et à l'acceptabilité du patient (Patel *et al.*, 2011).

Les films minces oraux (en anglais : TFO) imbibés de salive adhèrent au site d'application (la bouche) (Fig. 3.9). Le taux de désintégration est rapide, ce qui permet la libération du médicament suivie de l'absorption buccale (Prausnitz *et al.*, 2004).

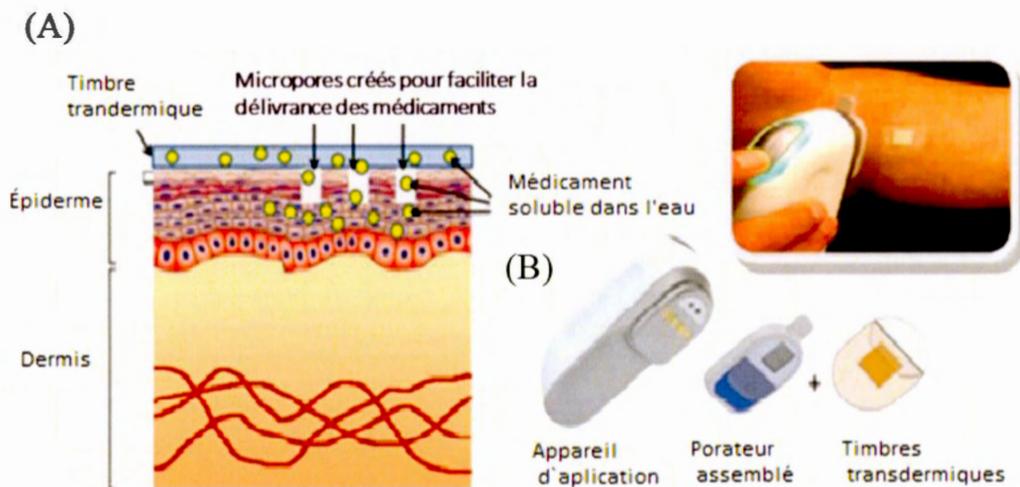
L'administration transdermique représente une alternative attrayante à l'administration orale de médicaments et est sur le point de constituer une alternative à l'injection hypodermique. De nombreux systèmes à libération prolongée ou contrôlée ont été conçus, dans lesquels un médicament est dissous ou dispersé dans le film (De La Fuente *et al.*, 2010).



**Figure 3.9** Sites pour l'application de film pour la muqueuse buccale et sublinguale. D'après (Prausnitz *et al.*, 2004).

L'administration transdermique est surtout utilisée lorsqu'il existe un effet de premier passage significatif du foie qui peut métaboliser prématurément les médicaments. L'administration transdermique présente également des avantages par rapport aux injections hypodermiques, qui sont douloureuses. La plus grande limitation est que seulement un nombre limité de médicaments peuvent être administrés par cette voie. Avec les méthodes d'administration actuelles, les médicaments transdermiques efficaces ont des masses moléculaires ne dépassant pas quelques centaines de daltons,

présentent des coefficients de partage octanol-eau qui favorisent fortement les lipides et nécessitent des doses de l'ordre de quelques milligrammes par jour ou moins (Ammar *et al.*, 2013). Dans presque tous les types de timbres transdermiques, le médicament est stocké dans un réservoir fermé d'un côté avec un support imperméable et doté d'un adhésif qui entre en contact avec la peau de l'autre côté (Nesseem *et al.*, 2011). Plusieurs facteurs affectent la biodisponibilité d'un médicament, comme sa taille moléculaire, sa polarité, son pH, l'état de l'hydratation de la peau et le métabolisme par la flore cutanée (Nesseem *et al.*, 2011; Rajasekaran *et al.*, 2010).



**Figure 3.10** Le principe (A) et l'appareil de livraison transdermale de médicament (B) D'après (Aktar *et al.*, 2014).

De même, l'hydratation de la peau est cruciale pour augmenter l'absorption des médicaments, ce qui est possible en utilisant un humectant dans la formulation du film. La société biotechnologique japonaise, Nitto, travaille également sur TDDS (en anglais : transdermal drug delivery system) avec le système Medtech PassPort. L'applicateur (porateur) libère une impulsion d'énergie pour créer des microcanaux dans la peau. Un simple patch transdermique est ensuite appliqué sur la peau ainsi

préparée et la délivrance du médicament commence (Fig. 3.10). En conclusion les films minces à base de polymères pourraient être une alternative très prometteuse pour l'administration de médicaments par voie transdermique en raison de la facilité d'application, de la flexibilité et de la bonne apparence cosmétique (Aktar *et al.*, 2014).

## CHAPITRE IV

### PRÉSENTATION DU PROJET DE THÈSE

Dans l'organisme, les ions métalliques sont impliqués dans un large éventail de fonctions biologiques intra et extracellulaires. Contrairement au cuivre lié à des protéines ou à des peptides, le cuivre non lié peut être hautement toxique en raison de sa capacité à générer des radicaux libres via la réaction de Fenton. Cependant, des petites molécules biologiquement actives, telles que des complexes du cuivre avec des acides aminés, peuvent posséder des propriétés thérapeutiques.

Le cuivre(II) coordonné avec un acide aminé (exemple  $[\text{Cu}(\text{His})_2]$ ) est essentiel au fonctionnement de nombreuses protéines. Ce complexe peut traiter certaines maladies neurodégénératives comme la maladie de Menkes. Un traitement par voie intraveineuse avec de complexe d'histidine:cuivre apporte un bénéfice thérapeutique mais l'administration par voie intraveineuse présente certaines limitations. Il y a donc un intérêt pour des complexes de cuivre(II) en vue de l'administration transdermique ou autres voies parentérales pour traiter diverses maladies liées au cuivre.

#### **A. Complexes de cuivre pour applications biomédicales : aspects structuraux, activité antioxydante et compatibilité neuronale**

La première partie de cette étude visait à coordonner le cuivre avec quatre petits ligands (L-Sérine, L-Histidine, Urée et Biuret) et à évaluer la stabilité, l'activité antioxydante

et la compatibilité neuronale des complexes résultants. Les complexes de cuivre avec les acides aminés, l'urée et le biuret peuvent agir en tant que piègeurs de radicaux libres oxygénés. Ces découvertes ouvrent de nouvelles perspectives pour l'utilisation des complexes de cuivre en tant qu'antioxydants et éventuellement en tant qu'agents thérapeutiques pour les maladies neurodégénératives. Cette étude décrit la préparation et la caractérisation de quatre complexes de cuivre de basse masse moléculaire :  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$  et  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$ , avec une emphase particulière donnée aux aspects liés à la stabilité de ces complexes dans des milieux physiologiquement pertinents, à leur activité antioxydante potentielle et à leur biocompatibilité avec les cellules neuronales en vue de leur utilisation éventuelle dans le traitement des maladies neurologiques. De plus, l'étude de ces complexes pourrait aider à améliorer le thérapie par chélation pour les dysfonctionnements du cuivre et à mieux comprendre le métabolisme du cuivre chez l'humain.

#### **B. Synthèse et caractérisation d'hydrogel PVA / chitosane avec différents agents de réticulation pour application transdermique**

De nouveaux films réticulés à base d'alcool polyvinylique (PVA) et de chitosane (Ch) ont été préparés en utilisant la technique de coulée en solution (anglais : « *casting* »). Le film composite (PVA-Ch) a été réticulé chimiquement par du STMP (tri-métaphosphate de sodium) et de la génipine (Gp). Le film composite réticulé pourrait présenter de bonnes propriétés mécaniques avec un faible degré de gonflement et offrir un large éventail d'utilisation potentiellement dans les applications biomédicales.

**Objectifs du projet de thèse :**

**I. Produire des complexes cuivriques à base d'histidine, de sérine, d'urée et du biuret.**

**II. Élaborer et étudier un nouveau matériau réticulé à base d'alcool polyvinylique et de chitosane.**

**III. Créer un nouveau system à libération transdermique du  $\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2$**

Les points expérimentaux liés aux objectifs principaux sont les suivants :

Pour l'objectif I :

- Ia Synthèse et caractérisation des complexes de cuivre
- Ib Évaluation des propriétés antioxydantes des complexes obtenus, en utilisant différentes méthodes pour initier les espèces réactives de l'oxygène.
- Ic Étude de la viabilité des complexes de cuivre et de leur ligand sur des cellules neuronales P19

Pour l'objectif II :

- Ila Synthèse de différentes variantes de films composites d'alcool polyvinylique et de chitosane avec différents agents de réticulation.
- Ilb Sélection du film composite approprié pour une administration contrôlée du médicament (en particulier pour  $\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2$ ).

Les hypothèses du projet :

1) Tenant compte que la céruloplasmine, la protéine à cuivre bleu circulatoire, possède des propriétés antioxydantes, cardioprotectrices et neuromodulatrices, et que, en dépit de son potentiel thérapeutique, la céruloplasmine ne peut pas être utilisée comme médicament en raison de sa nature protéique avec des risques immunogènes et dangers cause de son origine animale, nous avons émis l'hypothèse que les petits complexes

de cuivre pourraient présenter un intérêt à certains égards, étant comparables, sous certain aspects, aux protéines à cuivre (même type de coordination impliquant des acides aminés capables de chélater le cuivre(II)). Nous avons aussi émis l'hypothèse que les petits complexes de cuivre pourraient présenter un intérêt, étant comparables en certaine mesure au site actif des protéines de cuivre, mais avec une administration plus facile et une meilleure acceptabilité réglementaire.

2) Considérant que la polyvinyle l'alcool (PVA) présente une bonne biocompatibilité et que la chitosane retient une assez faible quantité d'eau à la formation des films, nous avons émis l'hypothèse que des matériaux composites de PVA et de chitosane (co)-réticulés pourraient former des films biocompatibles et à une faible teneur en eau. Ces capacités pourraient positionner les hydrogels de PVA-chitosane comme des candidats potentiels, en tant que biomatériaux pour le système d'administration du médicament par voies orale, buccale, transdermique, intramusculaire ou rectale.

La présentation schématique du projet (Fig. 4.1), essaie de résumer les principales étapes et de faciliter le suivi des travaux expérimentaux.

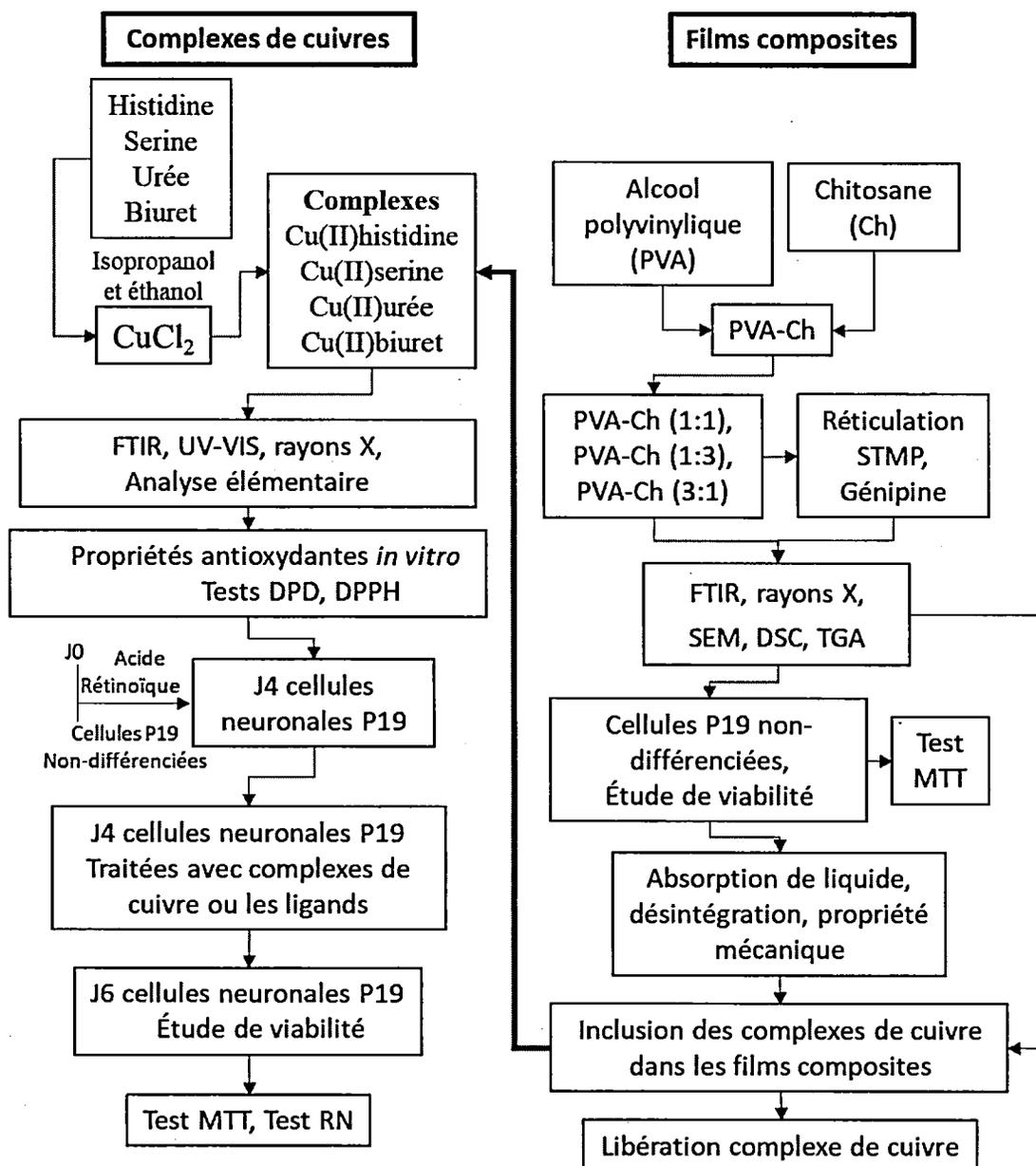


Figure 4.1 Présentation schématique du projet de thèse

PARTIE II

SECTION EXPÉRIMENTALE

## CHAPITRE V

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ce chapitre rapporte la méthodologie pour coordonner le cuivre avec quatre petits ligands (L-Sérine, L-Histidine, Urée et Biuret) et pour évaluer la stabilité, l'activité antioxydante et la compatibilité neuronale des complexes. La deuxième partie décrit la préparation des films à base de PVA et chitosane (avec ou sans complexe) réticulés avec différents agents, ainsi que leur caractérisation. En troisième partie, la libération du complexe de cuivre ou du médicament est étudiée ainsi que la cytotoxicité.

#### 5.1 Synthèse et caractérisation des complexes à cuivre

Les caractéristiques structurales ont été établies par composition élémentaire, diffraction des rayons X et FTIR. La stabilité a été évaluée à l'aide de profils d'absorbance UV-Vis dans l'eau, dans une solution de « serum physiologiques » (NaCl 0.9 %), dans les milieux gastriques et intestinaux simulés ainsi que par voltamétrie cyclique. La capacité antioxydante a été mesurée à l'aide des méthodes DPPH (1,1-diphényl-2,2-picrylhydrazyle) et DPD (N,N-diéthyl-p-phénylènediamine). La compatibilité neuronale a été évaluée à l'aide de mesures de viabilité cellulaire réalisées sur des cultures des cellules neuronales P19 dérivées des cellules souches de souris.

### 5.1.1 Synthèse de complexes de cuivre

Tous les produits chimiques étaient de « qualité réactifs » et ont été utilisés sans purification supplémentaire. Des complexes de cuivre ont été préparés dans l'isopropanol selon la procédure de Pop *et al* (Pop *et al.*, 2002). Le complexe cuivre(II)-histidine a été préparé en utilisant un rapport molaire 1 :2 de  $\text{CuCl}_2$  :His et une solution d'isopropanol : $\text{H}_2\text{O}$  à 50 :1 v/v. Une solution froide (400 mL) de  $\text{CuCl}_2$  ( $1.93 \times 10^{-3}$  mol/L) dans l'isopropanol a été ajoutée goutte à goutte à une solution aqueuse de His ( $3.84 \times 10^{-3}$ ) mol/L) à pH 6.8 et le mélange a été agité de manière continue sur la glace pendant 45 min. La complexation a été effectuée dans l'isopropanol pour faciliter la récupération du cuivre-histidine qui précipite dans ces conditions. Le solide résultant a été recueilli par filtration, lavé avec l'isopropanol froid et séché à température ambiante. Les complexes de cuivre-urée et de cuivre-biuret ont été préparés de manière similaire mais en utilisant un rapport molaire 1 :4 de  $\text{CuCl}_2$  :ligand. Le complexe cuivre-sérine a été préparé dans l'éthanol glacial en utilisant un rapport molaire 1 :2 :1 de  $\text{CuCl}_2$  :L-Ser :NaOH. Une solution froide (15 mL) de  $\text{CuCl}_2$  ( $2.64 \times 10^{-2}$  mol/L) dans l'éthanol a été ajoutée goutte à goutte à une solution de 30 mL de Ser ( $5.19 \times 10^{-2}$  mol/L) dans l'éthanol (50 :1 v/v l'eau) contenant de l'hydroxyde de sodium (0.01 mol/L). Le mélange a été agité sur la glace pendant 30 min et le solide résultant a été filtré, lavé à l'éthanol et séché à la température ambiante.

### 5.1.2 Caractérisation structurale

#### Analyse élémentaire

Les teneurs en carbone Allemagne, en hydrogène (H) et en azote (N) ont été déterminées par la méthode de combustion dynamique flash basée sur l'oxydation complète des échantillons, à l'aide d'un EAS1108 (Fisons instruments SpA) et d'un ECS4010 (Costech Co. California, É.-U.).

### Points de fusion

Les propriétés physiques d'un composé, telles que le point de fusion, peuvent fournir des informations utiles qui peuvent aider à identifier un échantillon ou à établir sa pureté. Les points de fusion ont été mesurés à l'aide de tubes capillaires ouverts sur un appareil à point de fusion Gallenkamp (Londres, Angleterre).

### Diffraction des rayons X

L'analyse par diffraction des rayons X a été réalisée avec un diffractomètre à jet Bruker X8 Venture Metal (Geesthacht, Allemagne). Les paramètres expérimentaux pour l'analyse par rayons X sont présentés dans le **tableau S.1 (Annexes)**. Les monocristaux ont été obtenus par évaporation lente d'une solution alcoolique de complexe de cuivre pendant trois jours. Les cristaux ont été maintenus à 100 °K pendant la collecte des données. Les échantillons ont été exposés à des rayons X- ( $\text{GaK}_\alpha$ ) d'une longueur d'onde de 1.34 Å et analysés dans une plage angulaire de  $2\theta$  comprise entre 10 et 121 degrés. La structure a été résolue à l'aide du logiciel Olex2 (Dolomanov *et al.*, 2009), avec le programme de solution de structure SHELXT (Sheldrick, 2008) utilisant Direct Methods de raffinement SHEXLXL (Sheldrick, 2015) avec la méthode de minimisation des moindres carrés.

### Spectroscopie infrarouge

Les spectres infrarouges par transformée de Fourier (FTIR) des complexes et des leurs ligands ont été enregistrés sur un spectrophotomètre FTIR Thermo-Nicolet 6700 (Madison USA), avec 64 numérisations à une résolution de  $4 \text{ cm}^{-1}$  en utilisant des pastilles de bromure de potassium; 2 mg de chaque échantillon mélangés avec 100 mg de KBr (séché au four) et compressées pour la mesure en FTIR.

### 5.1.3 Stabilité dans différents milieux

#### Mesures spectrophotométriques

Des solutions de 20 mM de His, Ser, Urée, Biuret et de leurs complexes de cuivre(II) ont été préparées dans de l'eau, dans une solution saline physiologique (0.9 % de NaCl), dans du fluide gastrique simulé (SGF : HCl 0.26 %, NaCl 0.2 %, pH 1.2) et dans le fluide intestinal simulé (SIF : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à 0.68 %, NaOH à 0.0615 %, pH 7.2). Les spectres d'absorbance (360 à 960 nm) ont été pris après 2 h d'incubation à la température ambiante. Les stabilités des complexes ont été étudiées en mesurant les valeurs d'absorbance à des longueurs d'onde constantes entre 0 h et 48 h à 37 °C, à l'aide d'un spectrophotomètre Visible Ultrospec 100 Pro (USA).

#### Mesures électrochimiques

Un ballon à trois cols a été utilisé pour les mesures électrochimiques. L'électrode de travail était une électrode de carbone vitreux de 3 mm de diamètre (BASi<sup>®</sup>); l'électrode de référence était une électrode Ag / AgCl saturée de NaCl et la contre-électrode était soit un fil de cuivre, soit une maille de platine (Alfa Aesar, Massachusetts, USA). Les solutions électrochimiques contenaient des complexes de cuivre fraîchement préparés dans une solution saline physiologique (NaCl 0.9 % m/v dans de l'eau désionisée) et ont été purgées à l'argon pendant 5 min. Toutes les mesures ont été effectuées sous atmosphère d'argon.

### 5.1.4 Capacité antioxydante

#### Méthode colorimétrique DPD (N, N-diéthyl-*p*-phénylènediamine)

Le réactif DPD a été acheté auprès de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ont été générées par électrolyse (10 mA, 400 V, 3 min) dans 3 mL de solution tampon Krebs-Henseleit (KH) modifié (en mM : NaCl

118, KCl 4.8, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgSO<sub>4</sub> 0.86, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 2.54, glucose 11 et EDTA 0.027) selon (Jackson *et al.*, 1986). La cellule d'électrolyse contenait 2.7 mL de milieu ELS KH en présence de 0.3 mL solution du complexe de cuivre ou du ligand à différentes concentrations. Un volume de 0.2 mL de la solution électrolysée (ELS) KH et avec du complexe ou ligand, a ensuite été ajouté à 0.8 mL de solution de DPD à 25 mg/mL. Les ROS générées par ELS réagissent rapidement avec la DPD pour former un produit d'oxydation ayant une absorbance spécifique à 515 nm (Moore *et al.*, 1984; Wang *et al.*, 1999). En présence de molécules antioxydantes, les ROS peuvent être neutralisés et donc indisponibles pour réagir avec le DPD. Les capacités antioxydantes des ligands et des complexes ont été exprimées en pourcentage de ROS restant dans la solution d'ELS et ont été calculées selon l'équation 5.1, où  $A_{100\% \text{ ROS}}$  est l'absorbance du tampon ELS KH contenant DPD (100 % de ROS en solution, en absence d'antioxydant) et  $A_{\text{échantillon}}$  est l'absorbance du tampon ELS KH contenant DPD et en présence du complexe de cuivre ou du ligand.

$$\% \text{ ROS} = (A_{\text{échantillon}} / A_{100\% \text{ ROS}}) \times 100 \quad (5.1)$$

#### Activité de piégeage des radicaux 1,1-diphényl-2,2-picrylhydrazyle (DPPH)

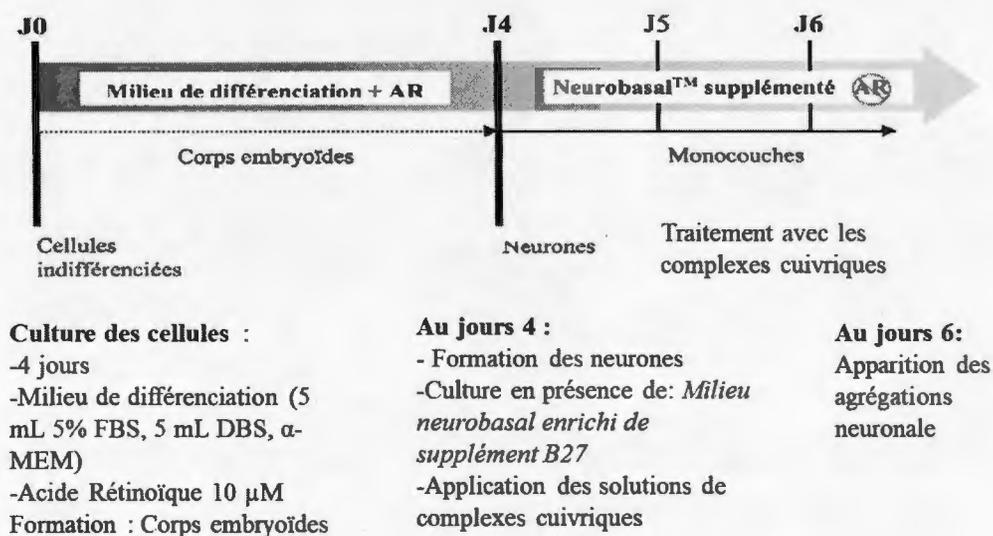
DPPH est un radical libre stable (DPPH•) caractérisé par une bande d'absorption à environ 517 nm. En présence d'une substance pouvant donner un atome d'hydrogène, le DPPH est réduit en perdant sa couleur violette. Le test DPPH a été réalisé dans les conditions de Brand-Williams (Marinova et Batchvarov, 2011). Le réactif DPPH a été acheté de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Une solution de DPPH 0.5 mM a été préparée et son absorbance était d'environ 0.7 à 517 nm. Un volume de 0.2 mL d'échantillon (complexes de Cu<sup>2+</sup> ou ligands) a été ajouté à 1.8 mL de solution de DPPH. Au bout de 30 min, l'absorbance a été mesurée à 517 nm. Le pourcentage de piégeage du radical DPPH a été calculé selon l'équation 5.2.

$$\% \text{ DPPH}^{\bullet} = [(A_{\text{br}} - A_{\text{ar}}) / A_{\text{br}}] \times 100 \quad (5.2)$$

où  $A_{br}$  est l'absorbance avant réaction et  $A_{ar}$  est l'absorbance après réaction avec l'antioxydant (complexe ou ligand).

### 5.1.5 Culture cellulaire neuronale et traitement avec complexes à cuivre

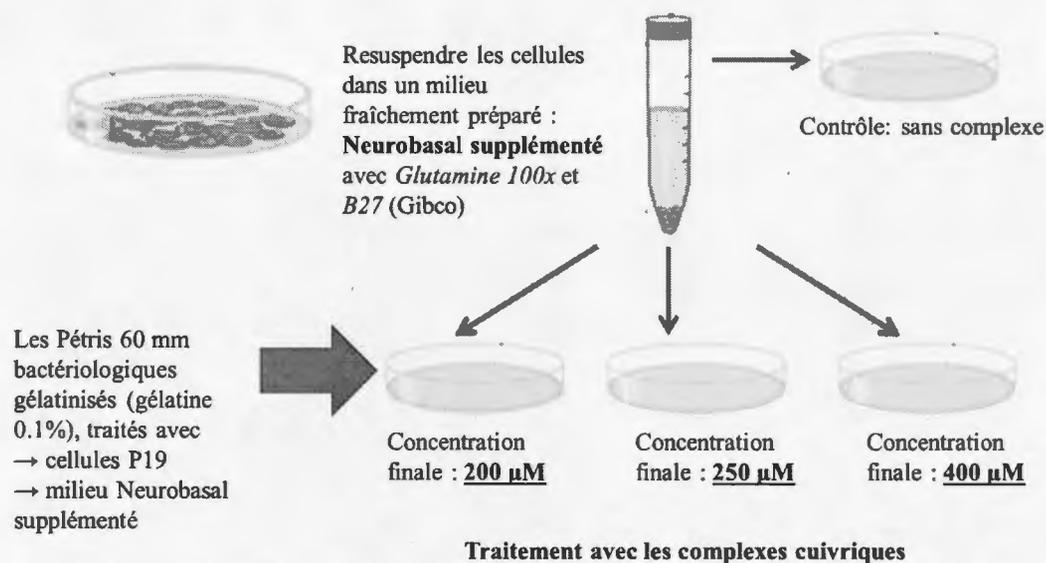
Les cellules souches embryonnaires P19 de souris ont été différenciées en neurones (Fig. 5.1 et 5.2) par exposition à 0.5  $\mu$ M acide rétinoïque (AR) pendant 4 jours (Ducharme *et al.*, 2010; Maltais *et al.*, 2003). Au jour 4, une quantité de  $3.8 \times 10^5$  neurones a été ensemencée dans des plaques gélatinisées à 12 puits contenant du milieu Neurobasal supplémenté [SNB : 2 % v/v de supplément B27 (Fisher Scientific, St-Laurent, QC, Canada), 0.5 mM L-glutamine, pénicilline 50 U/mL et streptomycine 50 U/mL].



**Figure 5.1** Différenciation des cellules P19 en cellules neuronales.

Le traitement de neurones avec des ligands His, Ser, urée ou biuret, ainsi que leurs complexes de cuivre(II) et le  $\text{CuCl}_2$  a débuté le 4<sup>ème</sup> jour, de manière concomitante avec l'ensemencement cellulaire dans le milieu SNB. Les huit agents étudiés (ligands et complexes de Cu(II) correspondants) ont été fraîchement solubilisés dans une solution

saline tampon phosphate (PBS) sous forme de solutions mères concentrées 10 fois et ajoutés individuellement au milieu de culture aux concentrations finales indiquées. Après 48 h d'incubation (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>), les cultures ont été analysées pour déterminer leur viabilité cellulaire. Les cultures témoins ne contenaient que les cellules dans du milieu SNB.



**Figure 5.2** Différenciation des cellules en neurones : traitement du J4. Application des solutions des complexes cuivriques.

#### 5.1.6 Viabilité cellulaire

La biocompatibilité a été évaluée à l'aide de cultures de neurones P19 et du test Neutral Red (NR) (Gomez Perez *et al.*, 2017) recommandé pour mesurer la viabilité des cellules exposées aux composés du cuivre à des concentrations supérieures à celles du cuivre à des concentrations physiologique. Un mL de solution NR fraîchement préparée (138 µM dans HEPES 20 mM, NaCl 140 mM, KCl 4 mM, CaCl<sub>2</sub> 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, D-glucose 20 mM, pH 7.2) a été ajouté à chaque puits de culture préalablement lavé délicatement avec PBS. Au bout de 2 h d'incubation (à 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>), la solution de NR a été retirée et les cultures ont été lavées rapidement avec

du formaldéhyde à 1 % et du chlorure de calcium à 1 %. Ensuite, 1 mL d'éluant NR (EtOH :H<sub>2</sub>O :acide acétique 50 : 49 :1) a été ajouté pour extraire le NR des cellules. Après 10 minutes d'agitation à la température ambiante, l'absorbance a été lue à 540 nm en utilisant un lecteur de microplaques universel ELX800 UV. La viabilité à 100 % a été établie avec des cultures témoins (non traitées). Les analyses ont été effectuées en double en utilisant trois cultures cellulaires indépendantes.

## 5.2 Synthèse, caractérisation et évaluation des films à base de PVA

Cette section explique comment des nouveaux films de polymère réticulé à base d'alcool polyvinylique (PVA) et de chitosane (Ch) ont été préparés en utilisant la technique de coulée en solution (« *casting* »). La structure chimique des films composites a été caractérisée par microscopie électronique à balayage (MEB), spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), analyse thermogravimétrique (TGA), calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et diffraction des rayons X. Les propriétés mécaniques et leur comportement de gonflement et de désintégration ont été évalués dans différents pH. La cytotoxicité des films et la viabilité cellulaire ont été étudiées par des essais au MTT avec les cellules P19 après 48 h. Des études de libération de médicament des films ont été effectuées à différentes valeurs de pH. Le complexe [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] a été chargé en tant que médicament traceur dans les films composites.

### 5.2.1 Matériels et méthode de préparation des films composites

Tous les sels et réactifs utilisés étaient de « reagent grade ». Le chitosane (Ch) ayant une masse moléculaire moyenne de 300 kDa et un degré de désacétylation (DD) de 88.1 % a été acheté auprès de Sigma Aldrich (Toronto, Canada). Le PVA (hydrolysé à plus de 98 %) avait une masse moléculaire moyenne de 130 000 g/mol. La génipine (GP, pureté > 98 % HPLC), le tri-métaphosphate de sodium (STMP, pureté ≥ 95 %) et le GA (glutaraldéhyde) (solution à 25 % m/v) ont été de Sigma Aldrich (Toronto,

Canada). Tous les produits chimiques ont été utilisés sans purification supplémentaire. Des solutions fraîchement préparées ont été utilisées dans toutes les expériences

#### La réticulation du chitosane / génipine

Le chitosane (Ch) a été dispersé dans une solution aqueuse d'acide acétique à 1 % (m/v) à la température ambiante avec agitation continue pendant 24 h pour amener la solution de Ch à 2 % (m/v). La solution, après dissolution complète, a été filtrée à travers un tissu de nylon pour éliminer tout matériau non dissout et laissée reposer pendant 30 min pour faire disparaître les bulles d'air. La solution de génipine (0.01, 0.05 ou 0.1 % m/v) a été ajoutée lentement à la solution de chitosane sous agitation constante pendant 20 min.

#### La réticulation PVA/ STMP

Des solutions de PVA ont été préparées en dissolvant complètement 10.0 g de poudre de polymère dans 100 mL d'eau distillée à une température de 95 °C sous agitation magnétique pendant 6 h pour obtenir une solution à 10 % (m/v) de PVA claire et homogène (Tripathi *et al.* 2010). La solution a été laissée pour refroidir à la température ambiante. Ensuite, 7.5 mL à 20 % p/v de l'agent de réticulation tri-métaphosphate de sodium (STMP) ont été ajoutés à la solution de PVA sous agitation constante. Un volume de 3 mL d'hydroxyde de sodium (30 % m/v) a ensuite été ajouté goutte à goutte, toujours sous agitation (Chaouat *et al.*, 2008). Le pH a été corrigé à  $7.0 \pm 0.2$  avec NaOH 0.2 M sous agitation douce. La solution de PVA réticulée obtenue a été soigneusement lavée avec de l'acétone (80 % p/v) pour éliminer le STMP n'ayant pas réagi, les sous-produits et les traces d'hydroxyde de sodium.

Le solide de PVA réticulé obtenu a été broyé dans un mélangeur pour acquérir des granules réticulées de PVA qui ont été séchées à la température ambiante (24 h), puis dissoutes dans l'eau distillée pour obtenir une solution à 5 % (m/v) sous agitation et chauffage constants. La solution de PVA réticulée a été soumise à l'appareil de

filtration (disque Cutoff 70 kDa) pour éliminer les sels et les traces résiduelles de la solution.

#### Préparation de la solution PVA / Chitosane composite

Les procédés de préparation des films sont résumés au **tableau 5.1**. Différentes quantités de solution de PVA ont été ajoutées à la solution à 2 % (m/v) de chitosane (**Tableau 5.2**) pour obtenir des rapports (m/m) PVA-Ch de (0 :1), (1:3), (1:1), (3:1) et (1:0).

**Tableau 5.1 Compositions des films selon différentes méthodes.** Composition des solutions filmogènes PVA-Ch contrôle (PVA-Ch/non-réticulé), PVA-Ch réticulé avec STMP et génipine selon différentes méthodes

Contrôle non réticulé	PVA + chitosane
Méthode 1 (M1)	PVA (réticulé avec STMP) + chitosane non-réticulé
Méthode 2 (M2)	PVA (réticulé avec STMP) + chitosane (réticulé avec génipine ) (0.01, 0.05, 0.1 % p/v )
Méthode 3 (M3)	PVA (réticulé avec STMP) + chitosane (non- réticulé) + génipine (0.01, 0.05, 0.1 w/v %)

Les films composites (PVA-Ch) ont été préparés à partir des solutions filmogènes selon trois approches différentes. Pour la première méthode (M1), le PVA a été réticulé séparément avec du STMP et mélangé avec du chitosane (Ch) non réticulé. Dans la méthode deux (M2), le PVA (réticulé par STMP) a été mélangé doucement avec chitosane (réticulé séparément avec la Gp). Dans la troisième méthode (M3), le PVA réticulé avec STMP et le chitosane (Ch) non réticulé ont été mélangés pour obtenir une solution homogène, puis la Gp comme co-réticulant (avec diffrent concentration) a été ajoutée délicatement.

**Tableau 5.2 Composition des films composites PVA:Ch.** Les solutions filmogènes de PVA et de chitosane ont été combinées avant (contrôle) et après une réticulation selon une des méthodes (M1, M2 ou M3) dans des rapports différents.

<i>Échantillon ID rapport molaire</i>	<i>PVA</i>	<i>Chitosane</i>	<i>STMP (% m/v)</i>	<i>Génipine (% m/v)</i>
PVA-Ch (1:0)	100	0	0	0
PVA-Ch (1:1)	50	50	0	0
PVA-Ch (3:1)	75	25	0	0
PVA-Ch (0:1)	0	100	0	0
PVA-Ch (1:3)	25	75	0	0
PVA-Ch /M1 (3:1) (1:3) (1:1)	75, 25, 50	25, 75, 50	1	0
PVA-Ch /M2 (3:1) (1:3) (1:1)	75, 25, 50	25, 75, 50	1	0.1, 0.05, 0.01
PVA-Ch /M3 (3:1) (1:3) (1:1)	75, 25, 50	25, 75, 50	1	0.1, 0.05, 0.01

Pour chaque préparation, la solution (mélange) filmogène a été maintenue sous agitation pendant 1 heure à la température ambiante pour former une solution binaire homogène. Pour chaque film la solution filmogène a été versée (30 mL) dans une boîte de Pétri (diamètre = 100 mm, hauteur = 15 mm) et laissée sécher à température ambiante (25 °C) pendant 3 jours. Avant toute caractérisation ultérieure, les films ont été séchés au four (à 40 °C) pendant 24 h pour éliminer les traces d'eau résiduelles (pour masse constante), puis placés dans un dessiccateur (avec gel de silice) pour éviter l'absorption d'humidité.

### 5.2.2 Caractérisation des films

#### La microscopie électronique à balayage

La morphologie de surface des films a été étudiée à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB) Hitachi (modèle S-3400N de type II, Japon). Les films (échantillons) ont été revêtus d'une fine couche de platine. Le faisceau d'électrons a été réglé à

5.00 kV.

#### Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Les spectres FTIR des échantillons de films ont été enregistrés sur un dispositif de réflectance totale atténuée (ATR) dans la plage de nombres d'onde allant de 4000 à 650  $\text{cm}^{-1}$  (64 balayages à une résolution de 4  $\text{cm}^{-1}$ ) en utilisant un spectromètre Thermo-Nicolet 6700 (Madison, WI, USA) équipé d'un détecteur sulfate-KBr (DTGS-KBr). Ils ont été utilisés pour caractériser la présence de groupes chimiques spécifiques dans les hydrogels.

#### Analyse thermogravimétrique (TGA)

Le comportement thermique et la stabilité des films de PVA-Ch préparés sont été évalués par un analyseur thermogravimétrique de modèle TGA-MS (TGA Q500 / Discovery MS, USA). Des essais de TGA ont été effectués de 20 °C à 900 °C, à une vitesse de chauffage de 10 °C/min sous atmosphère d'azote. Chaque l'échantillon, compris entre 2 et 5 mg, a été pesée et la masse du récipient à échantillon a été enregistrée de manière continue pendant l'essai, en fonction de la température.

#### Essai d'absorption de fluide

Le comportement de gonflement des films a été mesuré en plaçant les échantillons de film (5.0 mm x 5.0 mm) dans une plaque à 6 puits. Chaque puits a été rempli avec 2 mL de solution tampon phosphate (PBS; 0.01M, pH 7.4). Les films ont été incubés dans la plaque à 37 °C pendant 2, 4, 24, 96 h. À la fin de ces périodes, la solution en excès sur les gels était essuyée avec du papier absorbant avant de peser et d'enregistrer la masse du gel. Ce processus a été répété au moins trois fois pour chaque échantillon. Le degré d'absorption de fluide a été calculé à l'aide de l'équation 5.3 :

$$\text{Degré d'absorption de liquide (\%)} = \frac{(P_h - P_s)}{P_s} \times 100 \quad (5.3)$$

Où  $P_s$  est la masse sèche de l'échantillon et  $P_h$  est la masse de l'échantillon humide en fonction du temps d'immersion.

#### Test de désintégration (dissolution)

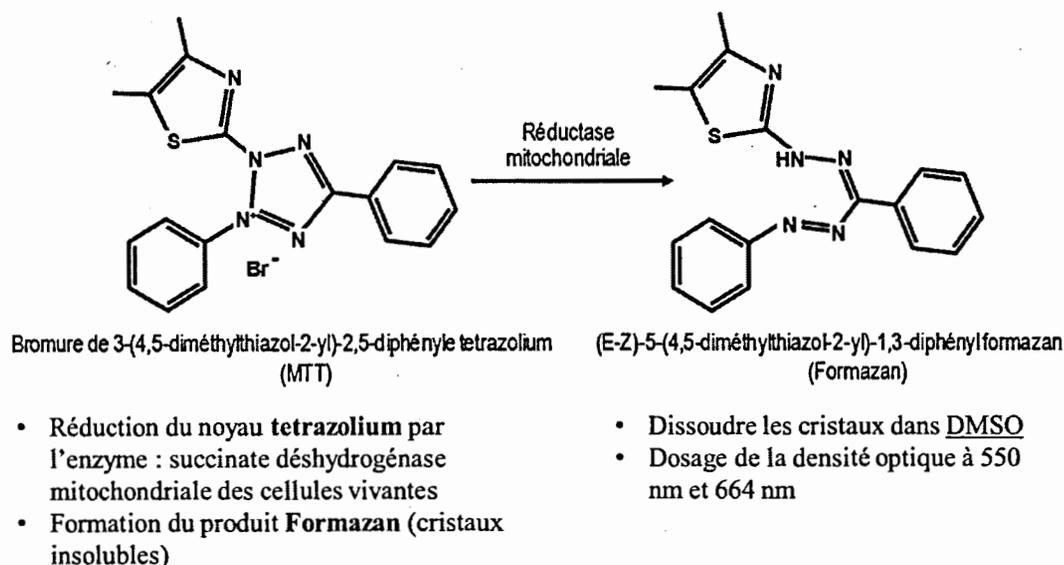
L'étude de la désintégration de tous les films composites a été réalisée en incubant les films dans du tampon phosphate (PBS) pH 7.4 à 37 °C. Tous les échantillons de film ont été chacun pesés avant ( $P_0$ ) et après ( $P_1$ ) immersion dans le PBS (Alhosseini *et al.*, 2012). Après immersion pour différentes durées (2, 24, 96 h), les échantillons ont été prélevés, épongés avec du papier absorbant et séchés dans un four à 40 °C pendant 24 h. Avant d'être pesés, les échantillons ( $P_1$ ) ont été conservés dans un dessiccateur à vide pendant 24 h. Le degré de désintégration a été calculé à l'aide de l'équation 5.4 :

$$\text{Degré de désintégration (\%)} = \frac{(P_0 - P_1)}{P_0} 100 \quad (5.4)$$

Où,  $P_0$  est la masse de l'échantillon (avant immersion) et  $P_1$  est la masse de l'échantillon restant (après immersion).

#### Analyse de cytotoxicité

La viabilité cellulaire avec films composites a été analysée en utilisant du MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium] comme indicateur (Fig. 5.3). Cet essai a été réalisé à l'aide de la lignée cellulaire de carcinome embryonnaire murin P19. Le test de cytotoxicité a été effectué en préparant les films dans une plaque à 96 puits. Les plaques ont été stérilisées par rayonnement ultraviolet (UV) pendant 2 h (Nikkhah *et al.*, 1992). Les lignées cellulaires ont été cultivées dans un milieu de propagation constitué du milieu essentiel minimal Eagle modifié alpha ( $\alpha$ MEM; Invitrogen, Burlington, ON, Canada) additionné de 10 % de sérum de veau fœtal (FBS; Rexade, ON, Canada) et de 100 U/mL de pénicilline / streptomycine (Sigma-Aldrich).



**Figure 5.3** Test de viabilité MTT sur des neurones P19. Principe : les réductases présentes dans les mitochondries et dans d'autres organites dans les cellules métaboliquement actives vont réduire le sel tétrazolium en cristaux de formazan.

Comme montré aux **figures 5.1 et 5.2**, les cellules P19 ont été cultivées et différenciées selon la littérature (Ducharme *et al.*, 2010) et elles se sont propagées dans un milieu complet. Les cellules ont été passées tous les deux jours dans des boîtes de culture de tissu. Ensuite, les cellules ont été détachées avec de la trypsine / EDTA avant ensemencement sur les échantillons. Les cellules ont été traitées à la trypsine, centrifugées et remises en suspension dans un milieu de culture complet. En bref,  $3 \times 10^5$  cellules ont été ensemencées sur les échantillons des films au sein d'une plaque à 96 puits. Les cellules ont été incubées à 37 °C dans une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 2 jours dans du milieu  $\alpha$ MEM. Après l'incubation (48 h), le surnageant de chaque puits a été retiré et remplacé par une solution de MTT (5 mg/mL) (Sigma Aldrich, Canada), puis 500  $\mu$ L de DMSO ont été ajoutés à chaque puits et incubés pendant 3 h à 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>). À la fin de la période d'incubation, 100  $\mu$ L ont été transférés dans une autre plaque à 96 puits en triplicata, et la densité optique

a été déterminée à 550 et 664 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque spectrométrique Lambda 740 (USA).

#### Cristallinité par diffraction des rayons X (XRD)

La diffractométrie des polymères par rayons X a été réalisée à l'aide d'un appareil Siemens D-5000 (Munich, Allemagne). Les échantillons ont été exposés à un rayonnement X (Cu K $\alpha$  à une longueur d'onde de 1.789 Å) avec une vitesse de balayage de 0.05 °/min. Des échantillons (films) ont été déposés sur une plaque de quartz à faible bruit de fond dans un support en aluminium et analysés par une plage de 2 $\theta$ . Les spectres DRX ont été traités à l'aide du logiciel DiffracPlus.

#### Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Les mesures DSC ont été effectuées sur un calorimètre DSC Q100 (TA, USA), la température a été étalonnée avec de l'indium dans une atmosphère d'azote. Des échantillons d'environ 8 mg ont été pesés de manière très précise dans une poêle en aluminium. La température était contrôlée dans la plage de 25 à 350 °C et la vitesse de chauffage était de 10 °C/min.

#### Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques des composites de chitosane et de PVA ont été déterminées à l'aide d'une machine d'essai de traction ElectroForce 3200 (USA). Tous les échantillons ont été immergés dans une solution tampon (PBS; pH 7.2) pendant 24 h. Les hydrogels complètement gonflés ont été découpés en espèces cylindriques de 5 mm de diamètre et de 12 mm de longueur, mesurées avec un compas numérique Mitutoyo. Chaque échantillon était fixé du haut et du bas avec des poignées conçues sur mesure. Les hydrogels ont été confinés dans un cadre métallique cylindrique et compressés à 0.5 mm/min, en utilisant une cellule de charge de 10 N. La contrainte est définie comme la force par unité de surface d'un matériau et la déformation est définie

par l'extension par unité de longueur. La contrainte ( $\sigma$ ) et la déformation ( $\varepsilon$ ) ont été obtenues selon les équations (5.5) et (5.6).

$$\sigma = \frac{P}{A} \quad (5.5)$$

$$\varepsilon = \frac{l_F}{l_0} \quad (5.6)$$

Où P représente la force de compression, A la surface du cylindre et  $l_0$  et  $l_F$  sont respectivement les longueurs initiale et finale. L'allongement à la rupture a été calculé selon l'équation 5.7.

$$\text{L'allongement à la rupture} = L_1 / L_0 \times 100 \% \quad (5.7)$$

Où,  $L_0$  est la longueur initiale et  $L_1$  la longueur finale. La pente de la courbe de contrainte-déformation dans la région élastique est appelée module de Young (E). La relation linéaire entre contrainte et déformation dans la région élastique de la courbe contrainte- déformation est connue sous le nom de loi de Hooke. À partir de la partie initiale de la courbe contrainte-déformation (chapitre 6.3.5), le module a été obtenu et les valeurs ont été rapportées en tant que moyenne de cinq déterminations  $\pm$  l'écart-type.

#### Absorption de fluide

Le gonflement des films a été mesuré en plaçant les échantillons de film (5.0 mm x 5.0 mm) dans une plaque à 6 puits. Chaque puits a été immergés avec 2 ml de solution de pH différent : une solution tamponnée au phosphate (PBS; pH 7.2) et une solution acide (HCl, pH 2.1). Les films composites incorporant du  $\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2$  ont été incubés et prélevés *in vitro* à 37 °C différents temps (2, 4, 24, 96 h). À la fin de chacune de ces périodes, la solution en excès sur les gels a été essuyée avec du papier absorbant avant de peser et d'enregistrer la masse du gel. Ce processus a été répété au moins trois fois

pour chaque échantillon. Le degré d'absorption de fluide a été calculé à l'aide de l'équation 5.8 suivante :

$$\text{Degré d'absorption de fluide (\%)} = \frac{(P_h - P_s)}{P_s} \times 100 \quad (5.8)$$

Où  $P_s$  est la masse sèche de l'échantillon et  $P_h$  est la masse de l'échantillon humide en fonction du temps d'immersion.

#### Chargement d'agent thérapeutique

Un agent actif a été chargé dans du PVA-Ch (3-1) non réticulé et réticulé (STMP 1 % et génipine 0.05 % en masse) par « casting ». L'acétaminophène et le complexe de cuivre(II)-histidine ( $\text{Cu}(\text{His})_2$ ) en pourcentage de charge (10 % en masse) ont été dissouts, séparément dans un minimum d'eau et chacune combinés avec la solution filmogène du PVA-Ch. La solution formée a été transférée dans une plaque (6 et 12 puits) et laissée à évaporer pendant une nuit à la température ambiante.

#### Comportements en matière de libération d'agent thérapeutique

Du  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  et de l'acétaminophène ont été chargés en tant que médicaments modèles dans les films. Les comportements de libération des médicaments ont été évalués à différents pH (7.2 et 2.1) sous agitation douce. Chaque échantillon (taille =  $2 \times 2 \text{ cm}^2$ ) contenant le médicament a été trempé dans 10 mL de solution tampon PBS (tube 50 mL) sur l'agitateur (100 tr/min) pendant 160 min à 37 °C (incubateur) (Liu *et al.*, 2015). Des aliquots du milieu de libération (1 mL) a été prélevé aux 30 minutes jusqu'à 180 minutes. La quantité de  $\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2$  et d'acétaminophène dans la solution tampon a été quantifiée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis à des longueurs d'ondes de 630 et 262 nm, respectivement. Après chaque mesure, le milieu retiré a été remis dans le système. Des solutions contenant des concentrations connues de médicaments dans de l'eau déionisée ont été utilisées pour calibrer et obtenir des courbes d'étalonnage

pour  $\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2$  et l'acétaminophène. La quantité de médicament libérée cumulative a été calculée selon l'équation 5.9 :

$$\text{Quantité de médicament libérée cumulative (\%)} = \frac{M_t}{M_\infty} \times 100 \quad (5.9)$$

Où  $M_t$  est la quantité de médicament libérée du film composite au temps  $t$  et  $M_\infty$  est la quantité de médicament préchargée dans le film composite.

## CHAPITRE VI

### RÉSULTATS

#### 6.1 Des complexes de cuivre pour des applications biomédicales : étude structurale, activité antioxydante et compatibilité neuronale

Ce chapitre visait à coordonner le cuivre avec quatre petits ligands (L-Sérine, L-Histidine, Urée et Biuret) et à évaluer la stabilité, l'activité antioxydante et la compatibilité neuronale des complexes résultants.

##### 6.1.1 Analyse chimique des complexes de cuivre

L'analyse élémentaire des complexes de cuivre préparés dans l'isopropanol ainsi que leurs propriétés physiques (couleur, masse moléculaire et point de fusion) sont présentées dans le **Tableau 6.1**.

Les résultats de l'analyse élémentaire ainsi que la formule chimique proposée pour chaque complexe correspondaient bien à la stoechiométrie attendue. Les points de fusion des complexes de cuivre étaient similaires à ceux des études précédentes (Mandal *et al.*, 2015; Sigel et McCormick, 1971).

**Tableau 6.1 Données analytiques et physiques des complexes de Cu(II) avec Ser, His, Urée et Biuret.** <sup>a</sup> Les valeurs calculées sont entre parenthèses. <sup>b</sup> La masse moléculaire a été déterminée selon analyses élémentaires.

Composé	Formule	Analyse élémentaire <sup>a</sup>			Couleur	MW <sup>b</sup> (g/mol)	Point de fusion (°C)
		% Trouvé (%)	% Calc. (%)				
		C	H	N			
[Cu(His) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> CuN <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	30.74 (32.34)	3.96 (4.05)	17.96 (18.29)	Bleue claire	444.00	185 ± 1.6
[Cu(Ser) <sub>2</sub> ]	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> CuN <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	26.28 (26.49)	4.35 (4.46)	10.08 (10.33)	Bleue foncée	271.72	186 ± 0.6
[Cu(Urea) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> CuN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	9.33 (9.42)	3.23 (3.14)	23.61 (21.99)	Bleue-verte	254.56	161.6 ± 2.3
[Cu(Biuret) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> CuN <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	14.59 (14.11)	2.98 (2.94)	25.02 (24.67)	Bleue-verte	340.61	171.6 ± 1.1

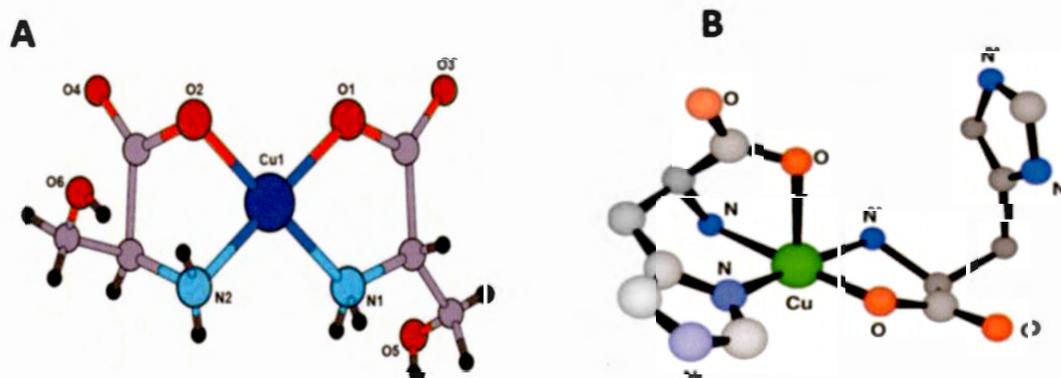
### 6.1.2 Étude cristallographique par diffraction de rayons X des structures des complexes de cuivre

Seuls [Cu(Ser)<sub>2</sub>] et [Cu(Urée)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] ont généré des cristaux adéquats pour l'analyse par rayons X. Les données [Cu(His)<sub>2</sub>] et [Cu(Biuret)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] proviennent de références Deschamp (Deschamps *et al.*, 2004) et Freeman (Freeman *et al.*, 1959), respectivement.

L'analyse structurale aux rayons X de monocristaux du complexe [Cu(Ser)<sub>2</sub>] a révélé que deux molécules de sérine se liaient chacune à l'ion cuivre de manière bidentée (Fig. 6.1A). Selon l'analyse élémentaire (Tableau 6.1) du complexe cuivre-sérine, les atomes de chlore ne sont pas présents dans la structure, ce qui diffère des autres complexes de cuivre dans cette étude. Cela pourrait être dû aux plusieurs facteurs influençant la structure, y compris la force de liaison métal-ligand, la stéréochimie du complexe et les réactions de déplacement de protons (Jeon *et al.*, 2005).

Dans le cas de [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] préparé dans l'isopropanol dans des conditions similaires à celles décrites pour [Cu(Urée)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] par Pop (Pop *et al.* 2002), nous n'avons pas obtenu de monocristaux. Cependant, les structures de diffraction des rayons X du cristal

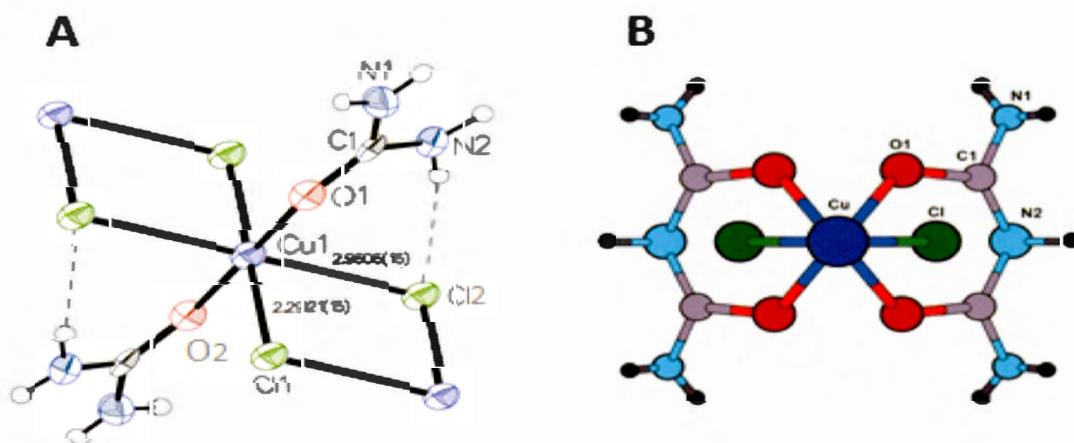
étaient similaires à d'autres complexes apparentés décrits précédemment (Corradi, 1992; Mandal *et al.*, 2014). Un complexe neutre à cinq coordinations  $[\text{Cu}(\text{His})_2]$  (**Fig. 6.1B**) a été décrit par Deschamps (Deschamps *et al.*, 2005). La présente étude a montré une géométrie pyramidale carrée déformée avec des ligands bidentés et tridentés de L-histidine (**Fig. 6.1B**). D'autre part, la structure de diffraction des rayons X sur les cristaux d'un autre complexe  $[\text{Cu}(\text{His})\text{Cl}_2]$  obtenu par Bujacz (Bujacz *et al.*, 2010) a montré que le cuivre était coordonné (semi-coordination) par une histidine uniquement de manière bidenté. L'oxygène de carboxyle ( $\text{O}_{\text{carboxyle}}$ ) et l'azote de l'amine ( $\text{N}_{\text{am}}$ ) du groupe de la chaîne principale de His ont été impliqués dans la coordination. Deux anions chlorure complètent la coordination carrée du  $\text{Cu}^{2+}$ .



**Figure 6.1** Structure de  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  bidenté (A) et  $[\text{Cu}(\text{His})_2]$  tridenté (B). Selon (Gala *et al.*, 2014).

Ces deux structures  $[\text{Cu}(\text{His})_2]$  et  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  rapportées ne correspondent pas à la formule chimique  $(\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{CuN}_6\text{O}_4)$  trouvée lors de l'analyse élémentaire dans cette étude. Dans notre cas, nous avons obtenu un complexe de cuivre différent, compatible avec deux molécules de His et deux chlorures qui se lient au cation central  $\text{Cu}^{2+}$  avec la structure de  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  (Esmaeili *et al.*, 2019). À notre connaissance cette structure est nouvelle. L'étude cristallographique du complexe d'urée  $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$  a

révélé une structure en chaîne, les ions chlorure jouant le rôle de ponts, comme indiqué sur la **figure 6.2A**. Les ions Cu(II) sont hexacoordinés par deux ponts de chlorure et par les atomes d'oxygène de deux molécules d'urée, montrant une stéréochimie octaédrique allongée. Les positions apicales semblent occupées par deux ligands pontant du chlorure semi-coordinés ( $\text{Cu1} - \text{Cl1} = 2.96 \text{ \AA}$ ); le plan équatorial est constitué de deux ligands d'urée et de deux ponts chlorure ( $\text{Cu1} - \text{Cl1} = 2.29 \text{ \AA}$ ) (**Tableau 6.2**).



**Figure 6.2** Structures obtenues par diffraction des rayons X pour  $[\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2]$ (A) et pour  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  (B).

La distance  $\text{Cu1}-\text{Cl1}$ . ( $2.96 \text{ \AA}$ ) semble trop grande pour une liaison covalente ( $r_{\text{Cl}} = 0.99 \text{ \AA}$ ) et est plus compatible avec une liaison ionique ( $r_{\text{Cl}^-} = 1.84 \text{ \AA}$ ,  $r_{\text{Cu}^{2+}} = 0.81 \text{ \AA}$ ) (**Tableau 6.2**). Bien que l'urée ait dans sa structure deux atomes donateurs d'électrons potentiels ( $\text{O}_{\text{carbonyle}}$  et  $\text{N}_{\text{am}}$ ), le cuivre n'est souvent coordonné que par l'atome d'oxygène selon un motif monodenté d'angle  $\text{C}=\text{O} - \text{M}$  souvent inférieur à  $180^\circ$  (Theophanides et Harvey, 1987). Au meilleur de nos connaissances, la structure cristalline attribuée à  $\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2$  est nouvelle.

**Tableau 6.2 Longueurs des liens pour [Cu(Urea)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>].**

Atome	Atome	Longueur (Å)
Cu1	Cl1 <sup>1</sup>	2.9605(16)*
Cu1	Cl1	2.2921(15)
Cu1	Cl1 <sup>2</sup>	2.9605(16)
Cu1	Cl1 <sup>3</sup>	2.2921(15)
Cu1	O1	1.955(4)
Cu1	O1 <sup>3</sup>	1.955(4)
O1	C1	1.262(8)
N1	C1	1.324(8)
N2	C1	1.345(9)

\* Le nombre entre parenthèses réfère au réseau cristallin défini par Bernal et Fowler (Bernal et Fowler, 1933).

Les molécules de biuret agissent comme des chélates bidentés via leurs atomes d'oxygène. Les données de coordination et les caractéristiques structurales des quatre complexes de cuivre(II) sont résumées dans le **Tableau 6.3**.

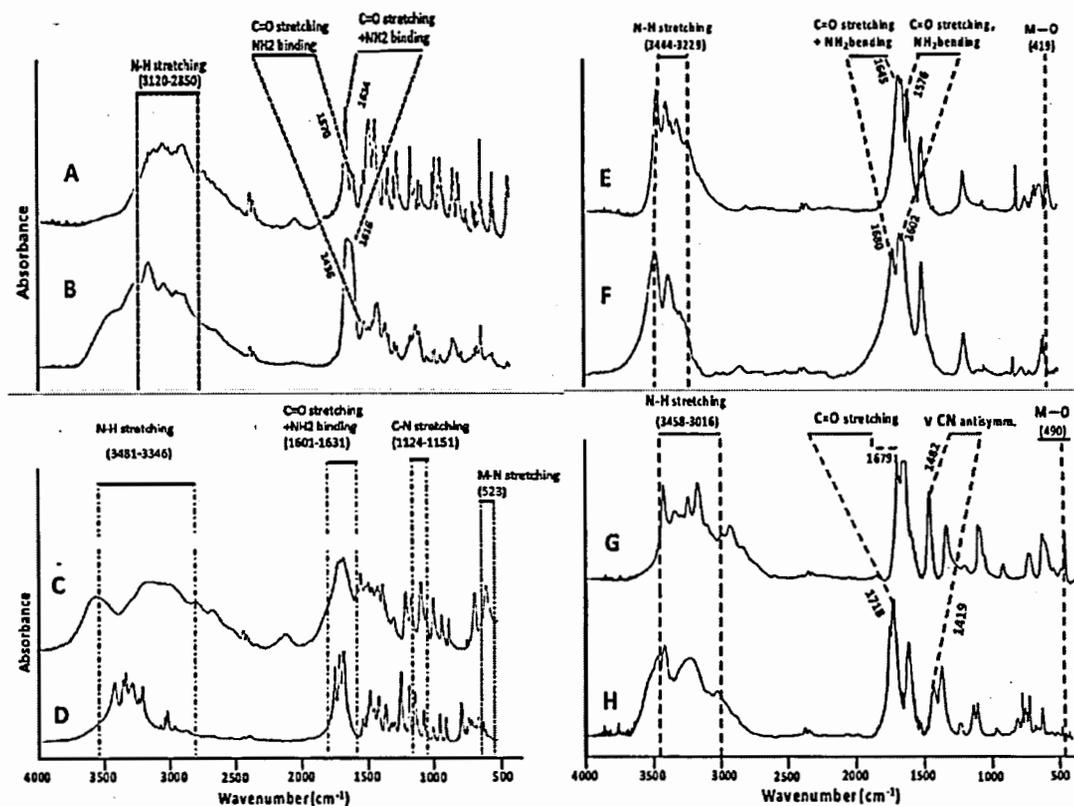
**Tableau 6.3 Caractéristiques structurales de la première sphère de coordination du cuivre pour les quatres complexes.**

Complexes	Mode de coordination	Atome impliqué	Distance Cu-X (Å)	Référence
[Cu(His) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	Tridenté	N <sub>am</sub> N <sub>im</sub> O <sub>carboxyle</sub>	2.003 1.984 2.277	(Deschamps <i>et al.</i> , 2005)*
[Cu(Ser) <sub>2</sub> ]	Bidenté	N <sub>am</sub> O <sub>carboxyle</sub>	2.001 1.972	Cette étude
[Cu(Urea) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	Monodenté	O <sub>carbonyle</sub>	1.955	Cette étude
[Cu(Biuret) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	Bidenté	O <sub>carbonyle</sub>	1.982	(Freeman <i>et al.</i> , 1959)

\* La référence décrit [Cu(His)<sub>2</sub>]

### 6.1.3 Caractérisation FTIR des ligands et des complexes de cuivre

Le spectre FTIR de  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  a montré des changements dans les positions et les profils de certaines bandes par rapport à celui de His libre (Fig. 6.3A, B).



**Figure 6.3** Spectres FTIR des différents complexes.  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  (A), His (B),  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  (C), Ser (D),  $[\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2]$  (E), urée (F),  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  (G) et biuret (H).

En général, dans les acides aminés, on observe une vibration d'étirement du NH dans la région  $3130\text{-}3030\text{ cm}^{-1}$  (El Khoury et Hellwig, 2009). Théoriquement, dans les complexes métalliques, la vibration d'étirement de NH ( $\nu\text{NH}_3^+$ ) devrait disparaître en raison de la coordination (Wilson *et al.*, 1970). Dans les complexes métalliques, cependant, une bande a été observée à  $3300\text{ cm}^{-1}$ , ce qui pourrait résulter d'autres

vibrations apparaissant dans cette région (Prenesti et Berto, 2002). L'histidine montre une fréquence d'étirement du COOH antisymétrique à  $1634\text{ cm}^{-1}$  (**Fig. 6.3B**) et  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  présente cette bande à  $1616\text{ cm}^{-1}$  (**Fig. 6.3A**). Ce changement dans la fréquence d'étirement est en accord avec les conclusions de Sarkar et Wigfield (Sarkar et Wigfield 1967) qui ont observé un décalage similaire pour  $[\text{Cu}(\text{His})_2]$  et d'autres complexes Cu(II)-acides aminés. Ces résultats indiquent la participation de ces groupes à la coordination du cuivre et au modèle de chélation tridentée du complexe  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ .

La **Figure 6.3 (C, D)** montre les spectres FTIR pour  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  et la sérine. Les bandes comprises entre  $3444$  et  $3259\text{ cm}^{-1}$  attribuées aux vibrations d'étirement du NH dans le spectre de l'acide aminé sont observées presque aux mêmes fréquences respectives dans le spectre  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ . Les bandes de vibration d'étirement NH de Ser sont à  $3346$  et  $3258\text{ cm}^{-1}$  respectivement et sont décalées vers des longueurs d'onde supérieures (Mandal *et al.*, 2014) dans un complexe métallique, soient  $3481$  à  $3398\text{ cm}^{-1}$ .

Ces résultats suggèrent clairement une déprotonation du groupe  $\text{NH}_3^+$  de la molécule Ser et une liaison à l'ion métallique par son atome d'azote (Herlinger *et al.*, 1970). Par contre, les bandes d'absorption Ser à  $1640$  et  $1601\text{ cm}^{-1}$  (correspondant à la liaison d'étirement C=O) sont décalées vers des longueurs d'ondes inférieures ( $1631$  et  $1587\text{ cm}^{-1}$ ) dans le spectre  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ . De plus, la bande d'étirement symétrique (M-N) apparue à  $523\text{ cm}^{-1}$  dans la présente étude est en accord avec les études précédentes (Mandal *et al.*, 2014).

Au total, ces observations indiquent que Ser se lie à l'ion métallique via ses groupes carboxyle et amine. La **Figure 6.3 (E, F)** présente les spectres FTIR obtenus pour l'urée et le  $[\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2]$ . Les bandes comprises entre  $3444$  et  $3259\text{ cm}^{-1}$  attribuées aux vibrations d'étirement du NH dans le spectre de l'urée sont observées presque aux mêmes fréquences respectives dans le spectre  $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$ . Cependant, les bandes d'absorption intenses pour l'urée à  $1680$  et  $1602\text{ cm}^{-1}$ , correspondant à l'étirement C=O

et aux vibrations de déformation de  $\text{NH}_2$ , sont décalées vers des plus basses fréquences ( $1616$  et  $1576 \text{ cm}^{-1}$ ) dans le spectre du complexe. Cela pourrait indiquer une possible implication de l'oxygène du groupe carbonyle de l'urée dans la coordination avec les ions cuivre(II) (Bujacz *et al.*, 2010). Ceci est également supporté par la bande de  $419 \text{ cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations M-O (Mandal *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 1999) dans les spectres  $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$ .

Les spectres FTIR du complexe  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  et biuret sont représentés sur la **Figure 6.3G, H**. Les bandes attribuées aux vibrations d'étirement de NH observées dans le spectre  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  sont similaires mais non identiques aux bandes de l'ordre de  $3458\text{-}3016 \text{ cm}^{-1}$  observées dans le spectre de biuret libre. Cela pourrait indiquer que probablement pas tous les azotes sont impliqués dans la formation du complexe. Une fréquence de vibration symétrique de l'étirement C=O apparaît vers  $1718 \text{ cm}^{-1}$  dans le spectre de biuret (**Fig. 6.3H**). Lorsque la coordination se produit, un décalage du mode d'étirement C=O vers une longueur d'onde inférieure a été signalé (Wang *et al.*, 2016), indiquant qu'une coordination pouvait être produite avec la participation de l'oxygène (Theophanides et Harvey, 1987). En fait, une bande de vibration dans le complexe  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  a été détectée à  $1679 \text{ cm}^{-1}$  (**Fig. 6.3G**). Comme dans le cas du complexe  $[\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2]$ , la présence d'une bande de  $490 \text{ cm}^{-1}$  attribuée à une vibration métal-oxygène suggère la participation de l'oxygène à une complexation de coordination entre l'ion biuret et l'ion cuivre(II). Ceci concorde avec les données antérieures de Wang (Wang *et al.*, 2016). Globalement, les résultats FTIR sont conformes aux structures illustrées (**Fig. 6.1 et 6.2**).

#### 6.1.4 Stabilité des complexes de cuivre dans des milieux physiologiques simulés

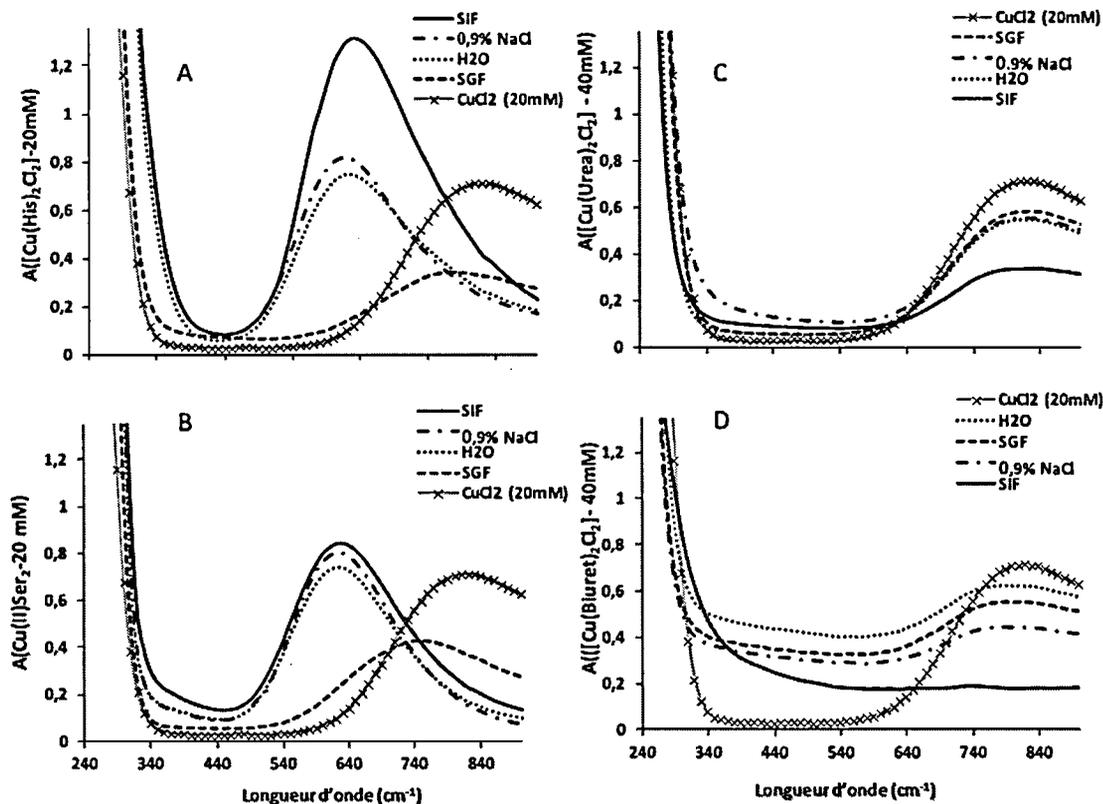
##### 6.1.4.1 Évaluation spectrophotométrique

L'évaluation de la stabilité des complexes de cuivre dans des conditions physiologiquement pertinentes facilitera la conception de leurs formulations

pharmaceutiques. Comme l'administration orale de complexes de cuivre sera éventuellement recherchée dans le traitement de la cardioencéphalomyopathie et maladie de la Menkes (suite à une thérapie génétique réparatoire de l'ATP7A), il était intéressant d'explorer leur stabilité dans des conditions simulant le système gastrique et intestinal. Les spectres d'absorption et la voltamétrie cyclique ont été utilisés comme outils pour l'indications de la conformation structurelle des complexes étudiés dans divers milieux. La **Figure 6.4** montre les spectres UV-Vis des complexes de cuivre(II) incubés pendant 2 h à température ambiante, dans H<sub>2</sub>O, SGF (pH 1.2), SIF (pH 7.2) et dans une solution saline physiologique NaCl 0.9 % (pH 7.2).

Les spectres du [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] dans H<sub>2</sub>O, dans une solution saline physiologique et dans SIF ont montré une absorbance maximale à 620-640 nm (**Fig. 6.4A**). L'absorbance en SIF était environ deux fois supérieure à celle observée dans H<sub>2</sub>O et NaCl 0.9 %, ce qui pourrait être attribué aux changements de pH.

L'ajout du complexe d'histidine de cuivre(II) 20 mM dans du H<sub>2</sub>O ou dans du NaCl à 0.9 % a abaissé le pH à environ 5.3, alors que le pH final du complexe dans le SIF était de 6.8, probablement en raison d'un meilleur pouvoir tampon. D'après Deschamps (Deschamps *et al.*, 2005), la distribution de l'espèce histidine de cuivre(II) diffère en fonction du pH : [MHL<sub>2</sub>] se trouve à pH 5 alors que [ML<sub>2</sub>] se trouve à pH 7. La présence ou l'absence de l'atome d'hydrogène aurait une influence sur les propriétés d'absorbance. Dans le SGF (pH 1.2), l'absorbance était maximale à 750 nm probablement à cause du cuivre non lié au vu de Deschamps *et al.*, 2005, suggère qu'à pH ≤ 3.7, la majeure partie du ligand résiduel est non liée. Au pH physiologique, la structure principale proposée pour [Cu(His)<sub>2</sub>] en solution aqueuse était [ML<sub>2</sub>] (Deschamps *et al.*, 2005).



**Figure 6.4** Spectres d'absorbance UV-Vis des complexes à cuivre. Complexe  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  (A),  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  (B),  $[\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2]$  (C), et  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  (D), dans différents fluides :  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.9 % NaCl (pH 7.4), SGF (pH 1.2), et SIF (pH 7.2), après 2 h à la température ambiante. Le spectre du  $\text{CuCl}_2$  en solution aqueuse est inclus à des fins de comparaison.

Lors de l'augmentation du pH ( $\text{pH} > 7$ ), le groupe amine est déprotoné pour donner un ligand chargé négativement, et l'ajout de  $\text{HO}^-$  ou l'ionisation de l'azote de type pyrrole dans le groupe imidazole peut induire la formation d'un complexe différent en milieu basique (une forme  $[\text{ML}_2(\text{OH})]$  qui dans notre cas peut être  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{OH}]$ ). De manière différente, lorsque la valeur du pH est inférieure ( $\text{pH} < 5$ ), l'azote du groupe imidazole est protoné et donc n'est plus impliqué dans la liaison au cuivre(II); ainsi plus de 50 % du cuivre peut être non lié (Deschamps *et al.*, 2005).

L'ajout de  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  n'a pas modifié le pH des quatre milieux. Les spectres de ce complexe étaient similaires dans  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$  0.9 % et SIF avec absorbance maximale à 630 nm (**Fig. 6.4B**). Contrairement, au SGF, comme pour l'histidine : cuivre(II), l'absorbance maximale était de 750 nm, ce qui pouvait être attribué à la protonation des groupes de coordination menant au cuivre non lié.

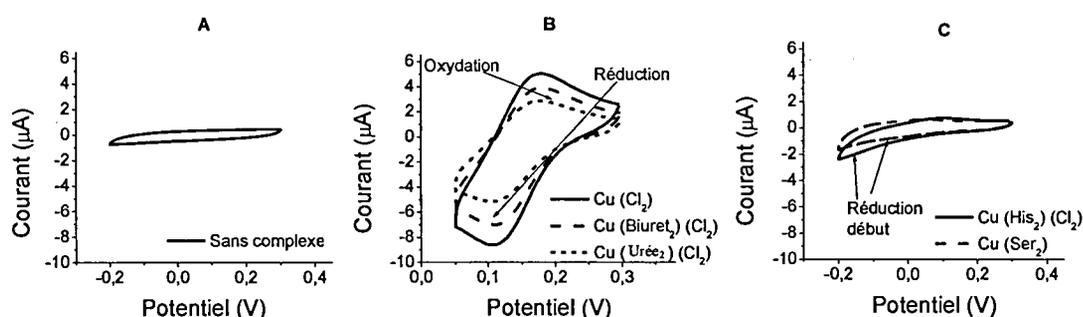
Les complexes  $[\text{Cu}(\text{urée})_2\text{Cl}_2]$  et  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  présentaient des bandes fortes dans le visible, similaires aux complexes de cuivre et d'acides aminés dans des milieux acides. Ces données correspondent bien à celles de Corradi (Corradi, 1992). Les spectres  $[\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2]$  (**Fig. 6.4C**) étaient similaires dans  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$  à 0.9 % et SGF, avec une absorbance maximale à 810 nm. En SIF, l'absorbance maximale a été légèrement décalée à 830 nm et avec une intensité de signal nettement inférieure (environ 50 % par rapport aux complexes de cuivre dans le milieu salin de 0.9 %  $\text{NaCl}$ ) probablement due à la présence de phosphate dans le SIF qui peut former un précipité par déplacement des deux anions chlorure générant le complexe cuivre(II) urée phosphate (Naumov *et al.*, 2001). De même, les spectres de  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  (**Fig. 6.4D**) dans  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.9 %  $\text{NaCl}$  au SGF ont présenté une absorption maximale à 810 nm et avec différentes intensités du signal dans chaque milieu. En SIF, la formation d'un précipité vert a été observée avec  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$ , ce qui peut expliquer la disparition du signal à 810 nm. Une absorbance encore observée dans la région 800-830 nm (région du  $\text{Cu}^{2+}$ ) suggère une dégradation du complexe et la présence d'ions de cuivre libres.

D'après Deschamps *et al.*, 2005, la structure tridentate confère une plus grande stabilité par rapport aux structures bidentée et monodentée (Deschamps *et al.*, 2005). Bien que le mode de coordination de Ser autour du centre du cuivre(II) soit bidenté, la stabilité relative du complexe sérine comparée à celle des complexes avec urée ou biuret pourrait résulter de l'architecture en un anneau chélaté à cinq chaînons thermodynamiquement stable. Les différences dans les spectres  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ , seraient

dues à la distribution des espèces d'histidine de cuivre(II) à différents pH (Deschamps *et al.*, 2005).

#### 6.1.4.2 Évaluation électrochimique

Les mesures de voltamétrie cyclique de chaque complexe ont été effectuées dans une solution saline physiologique. Chaque complexe (2 mM) a présenté une réponse quasi réversible (Fig. 6.5).



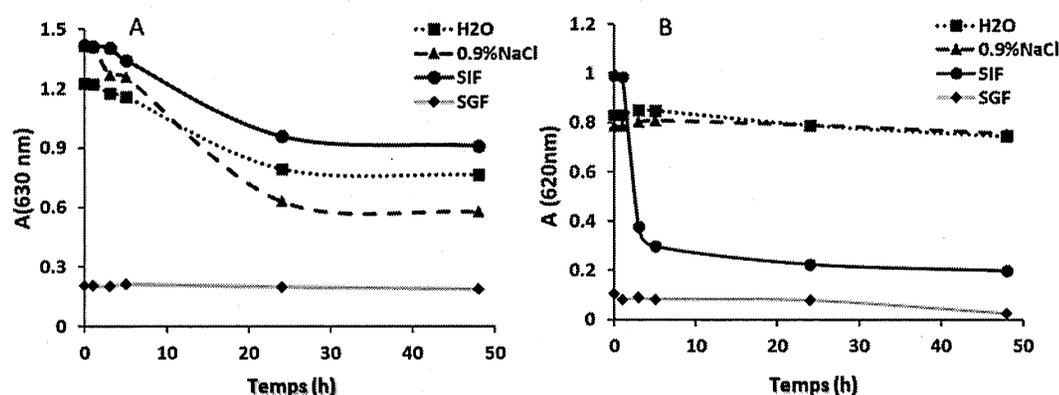
**Figure 6.5 Résultats de voltamétrie cyclique des complexes à cuivre.** Mesure de (A) bruit de fond de l'électrode (blanc), (B)  $\text{CuCl}_2$  (contrôle),  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  et  $[\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2]$  et (C)  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  et  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ , dans le tampon salin physiologique. Une électrode de Ag/AgCl de référence et une vitesse de balayage de 20 mV/s ont été utilisés pour chaque mesure.

Le début de la réduction et la valeur du mi-potentiel de  $\text{CuCl}_2$ ,  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  et  $[\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2]$  sont assez similaires, ce qui suggère une faible différence de leur potentiel de réduction (Fig. 6.5B). Comparée à  $\text{CuCl}_2$  ou aux complexes de cuivre urée et biuret, le début de la réduction de  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  et de  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  est cathodiquement déplacé et montre des pics de faibles intensités et peu résolus, rendant difficile l'attribution d'une valeur de mi-potentiel (Fig. 6.5C). Si le début de la réduction de chaque complexes est pris comme indicateur de la stabilité, alors sur basé sur les résultats des mesures voltamétriques,  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  et  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  ont des stabilités plus

élevées en comparaison avec  $\text{CuCl}_2$ ,  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  et  $[\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2]$  (Daniele et Pena, 1993).

#### 6.1.4.3 Stabilité dans le temps à 37 °C.

La stabilité des complexes de cuivre dans les différents milieux a également été évaluée par absorbance sur 48 heures à la température physiologique de 37 °C (**Fig. 6.6**).



**Figure 6.6** Évolution de l'absorbance des complexes à cuivre dans le temps et dans l'eau et différents fluides physiologiques simulés. Mesures prises à  $\lambda_{\text{max}}$  et à 37 °C pour les complexes  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  (A) et  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  (B). Les complexes avaient une concentration finale de 20 mM. Lectures prises à 0, 1, 2, 3, 5, 10, 24 et 48 h; les valeurs présentées sont la moyenne des trois analyses indépendants. Les spectres individuels d'absorbance entre 360-960 nm sont présentés dans les (**Figures S1A,S1B**) en annexes.

Les valeurs d'absorbance à 630 nm du complexe de cuivre(II)-Histidine (**Fig. 6.6A**) dans SIF, dans l'eau et dans NaCl à 0.9 % étaient similaires. Elles ont diminué progressivement avec le temps jusqu'à 24 h puis sont restées constantes. La valeur d'absorbance dans SGF était constante et faible (environ 0.2) pendant toute la période. Les valeurs d'absorbance du complexe de cuivre(II)- sérine (**Fig. 6.6B**) à 620 nm étaient

similaires dans H<sub>2</sub>O et NaCl à 0.9 % et constantes jusqu'à 48 h. En revanche, l'absorbance en SIF a diminué rapidement de 1 à 0.3 après 2 h (probablement par effet matrice des ions phosphate). Depuis, la valeur d'absorbance a peu changé pendant l'intervalle de 48 heures, indiquant une stabilité plus faible de [Cu(Ser)<sub>2</sub>] dans SIF à (37 °C) par rapport à la température ambiante.

Dans le cas des complexes d'urée et biuret, les absorbances à 810-830 nm (Annexes, **Fig. S1C, S1D**) étaient dues au cuivre(II) libre et étaient constantes, ce qui suggère que les complexes [Cu(urée)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] et [Cu(Biuret)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] ne sont pas stables. Ils présentaient des profils spectraux similaires à 37 °C (Annexes, **Fig. S2**) et à la température ambiante. Ils peuvent être considérés instables dans ces conditions.

En conclusion, comparés aux complexes de cuivre(II)-urée et de cuivre(II)- biuret, les complexes de cuivre(II) avec les acides aminés His et Ser présentent une stabilité relativement plus élevée à température ambiante pendant plus de 5 heures à 37 °C. Une stabilité la plus élevée a été observée pour le cuivre(II)-sérine dans les milieux H<sub>2</sub>O et NaCl 0.9 %.

#### 6.1.5 Capacité antioxydante *in vitro*

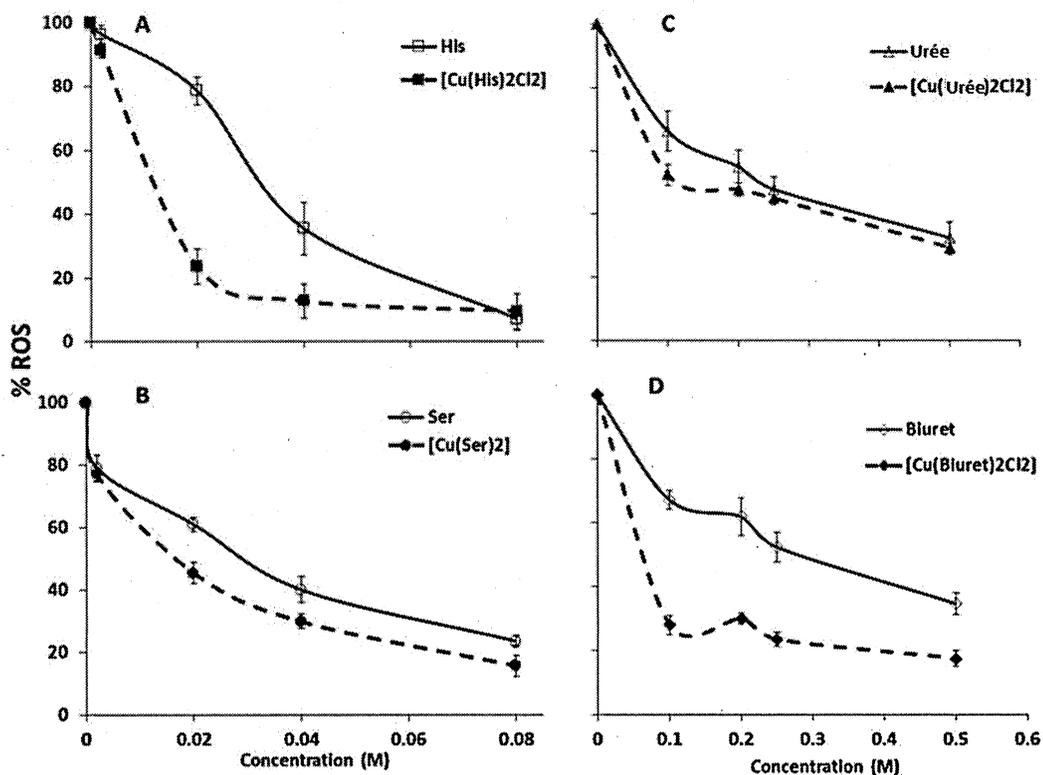
Compte tenu de la complexité des processus oxydatifs et de la nature hydrophile et hydrophobe diversifiée des antioxydants, il n'existe pas de méthode unique et bien définie pour la mesure quantitative de l'activité antioxydante. Dans la plupart des cas, il est nécessaire de combiner les réponses à des tests différents et complémentaires pour avoir une indication de la capacité antioxydante d'un échantillon (Huang *et al.*, 2018).

Pratiquement, selon les réactions impliquées dans les processus de piégeage, les antioxydants peuvent neutraliser les radicaux libres par deux mécanismes différents : le transfert d'hydrogène atomique (THA) et le transfert d'électron unique (SET) (Wright *et al.*, 2001). Les méthodes basées sur le THA mesurent la capacité d'un antioxydant à piéger les radicaux libres en faisant un don d'atome-H. Les méthodes

basées sur SET mesurent la capacité d'un antioxydant à transférer un électron pour réduire un oxydant, souvent associé à un changement de couleur (Jackson *et al.*, 1986; Niki et Noguchi, 2000). Dans la présente étude, les capacités antioxydantes des complexes de cuivre et de leurs ligands ont été évaluées à l'aide de deux types de tests, le test DPPH pour le mécanisme THA et le test DPD pour le mécanisme SET. L'électrolyse du tampon KH (10 mA, 400 mV, 1 min) peut générer des ROS telles que l'anion superoxyde ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ), le radical hydroxyle ( $\bullet\text{OH}$ ) et leurs sous-produits: le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et l'ion hypochlorite ( $\text{ClO}^-$ ) (Huang *et al.*, 2005). La génération de ROS est déterminée par le pourcentage d'oxydation de DPD. En présence de complexe de cuivre ou aux ligands, une partie des ROS peut être piégée, laissant moins de ces espèces disponibles pour oxyder la DPD.

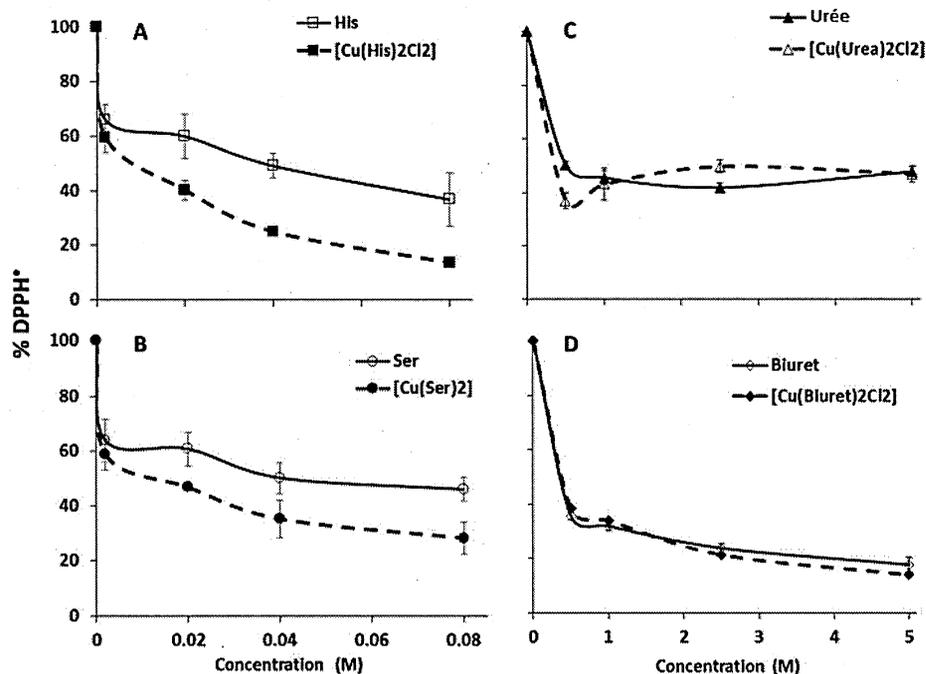
La **Figure 6.7** montre que tous les composés ont une certaine capacité à piéger les ROS par rapport aux conditions de contrôle (100 % de ROS). Kohen *et al.* ont rapporté que l'histidine et ses dérivés ayant un groupe imidazole avaient une activité antioxydante due au don d'hydrogène (Kohen *et al.*, 1988).

Nous avons constaté que le complexe  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ , à des concentrations égales ou supérieures à 0.02 M, présentait une activité de piégeage supérieure à celle du ligand seul et des autres complexes de cuivre (**Fig. 6.7A**). De manière différente, les complexes sérine-cuivre(II) et urée-cuivre(II) présentaient des capacités de piégeage des ROS proches de celles de leur ligand libre (**Fig. 6.7B, C**). Un fait intéressant, l'activité antioxydante du  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  était environ deux fois supérieure à celle de son ligand libre (**Fig. 6.7D**) et à celle de l'urée et de  $[\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2]$ . Les groupes amide du biuret et les atomes d'azote des groupes imidazoles de His peuvent servir de groupement électrodonneurs efficaces pour neutraliser les ROS.



**Figure 6.7** Capacité de piégeage de ROS des complexes de cuivre et des ligands libres déterminée par la méthode avec DPD. Les capacités antioxydantes sont inversement proportionnelles aux pourcentages de ROS restantes après l'électrolyse de solutions de KH en présence des concentrations indiquées de complexes de cuivre(II) ou de ligands. Notez les différentes échelles de concentration entre A, B (0.002-0.08 M) et C, D (0.1-0.5 M). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM (n = 3).

La capacité antioxydante des complexes de cuivre(II) et de leurs ligands a également été mise en évidence par le test DPPH, recommandé pour les composés contenant des groupes SH, NH et OH (Caillet *et al.*, 2011; Popovici *et al.*, 2009). La **Figure 6.8** montre que les huit composés peuvent éliminer le DPPH•.



**Figure 6.8** Capacité de piégeage des radicaux libres des complexes de cuivre et des ligands libres évalués par le test DPPH. Les capacités antioxydantes sont inversement proportionnelles aux pourcentages de DPPH restant en présence des concentrations indiquées des complexes ou des ligands du cuivre(II). Notez les différentes échelles de concentration entre A, B (0.002-0.08 M) et C, D (0.5-5 M). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM (n = 3).

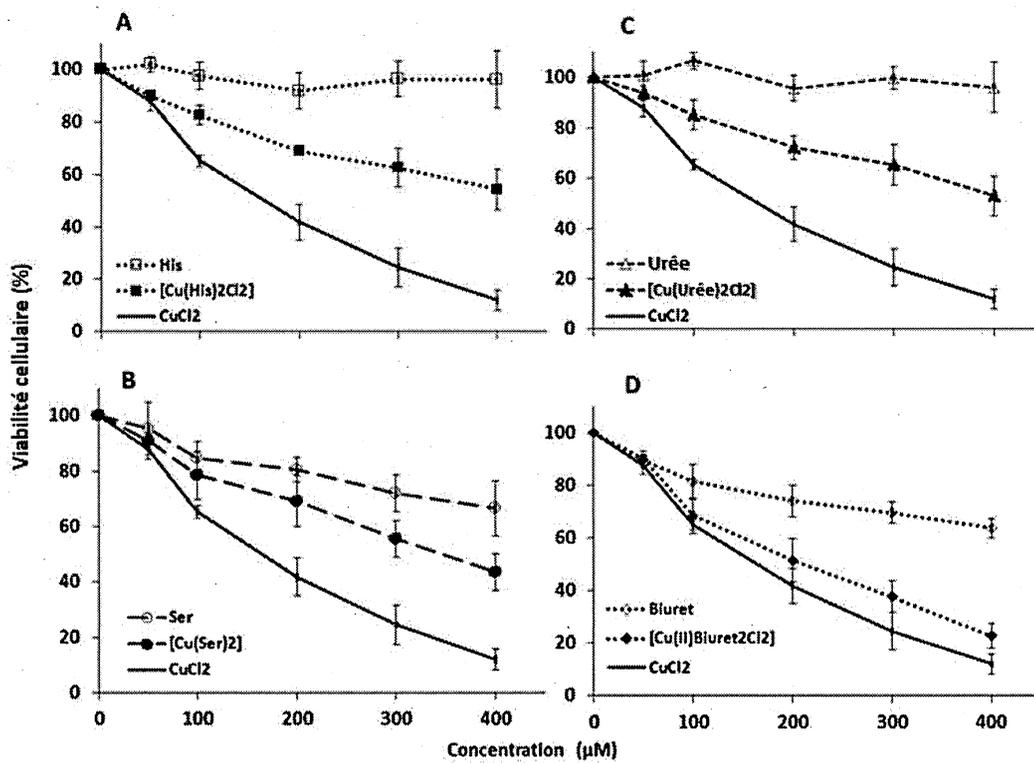
Le complexe  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  présentait la plus grande capacité antioxydante par rapport à l'histidine elle-même (**Fig. 6.8A**) et aux autres complexes et ligands de cuivre (**Fig. 6.8B, C, D**). Biuret et  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  (**Fig. 6.8D**) présentaient également une capacité antioxydante, mais à une concentration 5 fois supérieure à celle de  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ . Les activités de piégeage des ROS du complexe  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  et  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  apparaissent comme dépendantes de la concentration. Différemment, dans le cas de  $[\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2]$  et de  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$ , comme pour leurs ligands, il y avait deux étapes: une forte capacité de piégeage initiale exercée à une faible concentration (0.5 M) suivie d'une

autre étape lorsque la capacité de piégeage était presque maintenue à une concentration élevée (jusqu'à 5 M, Fig. 6.8C,D). Il a été rapporté que la réaction entre un antioxydant et le DPPH• se serait produite apparemment en deux étapes (Mishra *et al.*, 2012; Zou *et al.*, 2016) : (i) une étape rapide (1-2 min) consistant essentiellement en une soustraction des atomes de H les plus labiles de l'antioxydant, et (ii) une étape de neutralisation lente (30 min) reflétant une activité restante sur les produits d'oxydation / dégradation dérivés de la première étape.

Il est maintenant rapporté que les complexes de Cu(II) ont la capacité de piéger le radical DPPH par donation d'hydrogène des groupes NH, en mentionnant que l'acide ascorbique, un antioxydant utilisé comme standard (0.002-4M), a démontré une activité antioxydante plus forte que celle des complexes de cuivre synthétisés (données non présentées). Il est à noter que pour les complexes de cuivre étudiés, comme pour leur ligands, les données obtenues avec la méthode DPPH étaient en accord avec celles de la méthode DPD. La complexation avec Cu(II) peut moduler la caractéristique des acides aminés et influencer la capacité antioxydante. Dans le cas de l'histidine, le cuivre de la complexation a nettement augmenté cette capacité, alors que pour [Cu(Ser)<sub>2</sub>], cette augmentation était inférieure. Aucune différence n'a été trouvée pour [Cu(Urée)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] et pour [Cu(Biuret)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] par rapport à leurs ligands. Probablement, en raison de leur plus faible stabilité, [Cu(Urée)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] et [Cu(Biuret)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] ont perdu le Cu<sup>2+</sup> libérant les ligands. L'urée et le biuret seuls présentent apparemment aussi une capacité considérable à piéger des radicaux. Ces observations sont en accord avec les données précédentes sur l'urée en tant qu'antioxydant et en tant que cardioprotecteur (Wang *et al.*, 1999).

#### 6.1.6 Biocompatibilité des complexes et ligands de cuivre

L'histidine et l'urée présentent une bonne biocompatibilité à des concentrations allant jusqu'à 0.4 mM (Fig. 6.9A, C).



**Figure 6.9 Viabilité cellulaire en présence de différentes concentrations de complexes de cuivre et de ligands.** Les neurones P19 ont été incubés pendant 48 h en présence de chaque complexe ou ligand correspondant, et leur viabilité a été évaluée par le test d'absorption de NR et rapportée en pourcentage par rapport à celle des cultures témoins (pas de complexe et pas de ligand). La viabilité des cellules traitées avec CuCl<sub>2</sub> a été incluse à des fins de comparaison. Les valeurs (moyennes ± SEM) correspondent à trois cultures cellulaires indépendantes.

La bonne biocompatibilité de l'urée correspond aux concentrations d'urée de 2.3 à 6.5 mM rencontrés dans le cerveau humain adulte normal (Decaux, 2001). Ser et biuret ont entraîné une perte modérée de viabilité dépendante à la concentration avec une viabilité restante d'environ 70 % à une concentration de 400 μM, dans les deux cas (Fig. 6.9B, D).

Contrairement à l'urée, le biuret induit une diminution de la viabilité (**Fig. 6.9D**). La concentration physiologique normale de cuivre dans le parenchyme cérébral est de 70  $\mu\text{M}$  et des concentrations allant jusqu'à 1300  $\mu\text{M}$  ont été observées dans le cerveau de patients atteints de la maladie de Wilson (Scheiber *et al.*, 2014). Nos observations de diminution marquée de la viabilité neuronale avec des concentrations de  $\text{CuCl}_2$  de 100 à 400  $\mu\text{M}$  (**Fig. 6.9**) vont dans le même sens.

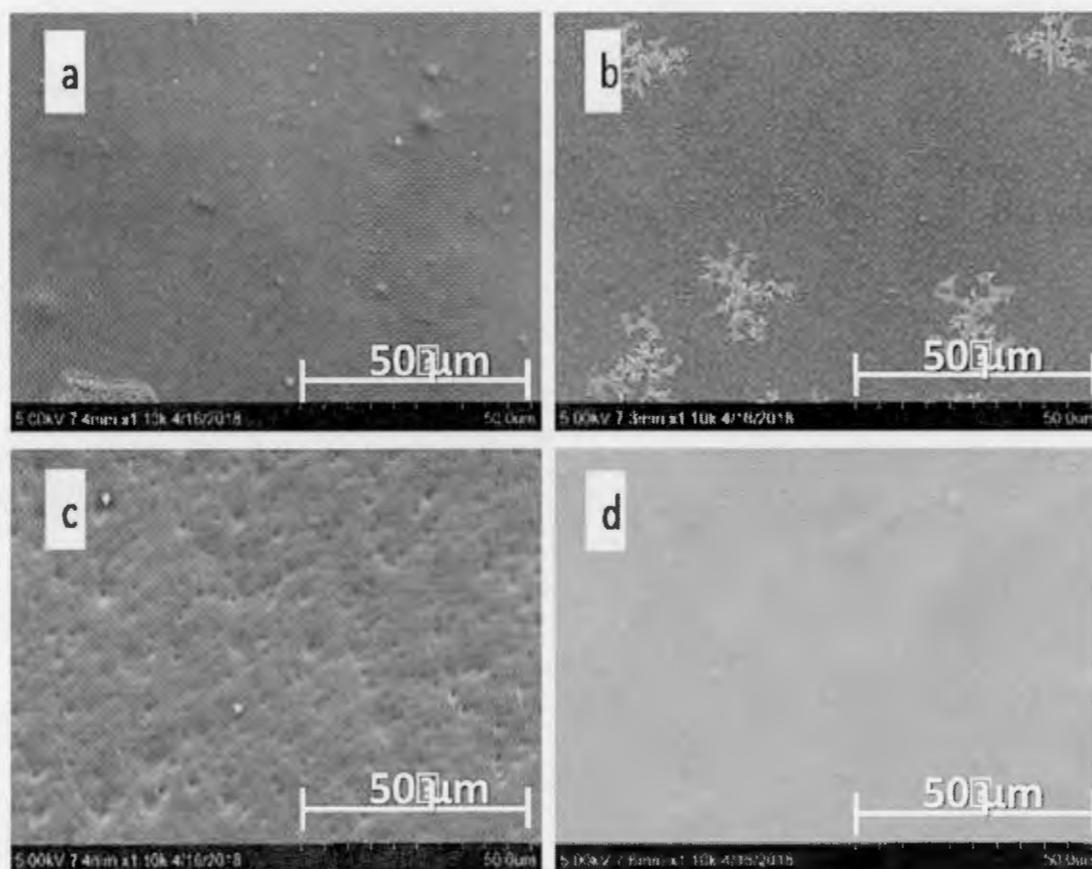
Comparés à l'histidine libre, à la sérine, à l'urée et au biuret, les complexes de cuivre correspondants induisent une perte de viabilité cellulaire de manière dépendante de la concentration (**Fig. 6.9**). Les complexes,  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  et  $[\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2]$  ont montré une biocompatibilité similaire avec les neurones P19 (70 % de viabilité cellulaire à 200  $\mu\text{M}$ ) tandis que celle de  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  était proche de celle de  $\text{CuCl}_2$  (environ 50 % de la viabilité des cellules à 200  $\mu\text{M}$ ), ce qui concorde peut-être avec la faible stabilité de ce complexe. Par conséquent,  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2]$  et  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  à des concentrations relativement élevées (400  $\mu\text{M}$ ) ont modérément altéré la viabilité neuronale contrairement à, His et l'urée.

## 6.2 Synthèse et caractérisation des films d'alcool polyvinylique, de chitosane et composites modifiés par co-réticulation avec la gènipine et le STMP

Les variantes expérimentales pour obtenir des solutions filmogènes et les films correspondants étaient nombreuses. Ce chapitre présente des aspects structuraux et des caractéristiques physico-chimiques des films qui ont été retenus pour les applications suivantes : inclusion des agents bioactifs et utilisation comme support biocompatible pour des neurones en culture et comme matrice dans des patches (bandes) adhésives. Les résultats, incluant les films qui ont été considérés non-adéquats pour des applications futures, sont présentés en annexe pour caractérisation physico-chimiques permettent, par étude comparative, la compréhension des besoins à suivre dans le processus d'obtention des films.

### 6.2.1 Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les images obtenues par microscopie électronique à balayage ont présenté différents aspects morphologiques du PVA et du PVA-Ch (3-1) avant et après la réticulation. La **Figure 6.10a** montre que la surface de Ch est très lisse, plane et qu'une phase continue a été obtenue.



**Figure 6.10** Micrographies MEB de films (a) Chitosane, (b) PVA, (c) PVA-Ch (3-1) non- réticulé, (d) PVA-Ch/GP (3-1) composites réticulés.

La micrographie de PVA sur la **Figure 6.10b** montre une surface plate avec quelques cristaux. L'ajout de Ch dans le polymère PVA semble créer des pores dans les

structures; et ces pores augmentent remarquablement avec l'augmentation du contenu en Ch (De Souza *et al.*, 2009). La **Figure 6.10c**, présente le PVA-Ch (3-1) non réticulé avec une surface rugueuse recouverte des pores et des trous sur la structure. Ces résultats suggèrent que le chitosane réduisait la cohérence de la structure du PVA, ce qui pourrait diminuer les densités du réseau à cause des pores et perturbait les réseaux de polymères tridimensionnels stables. La **Figure 6.10d**, montre le film PVA-Ch (3-1) après réticulation avec STMP (1 % m/v) et GP (0.01 % m/v) ajoutés dans le mélange de PVA-Ch (3-1) ce qui a changé la morphologie de surface du film. La surface du film de PVA-Ch/réticulé est très lisse et homogène, sans porosité ni fissure, avec globalement une bonne intégrité.

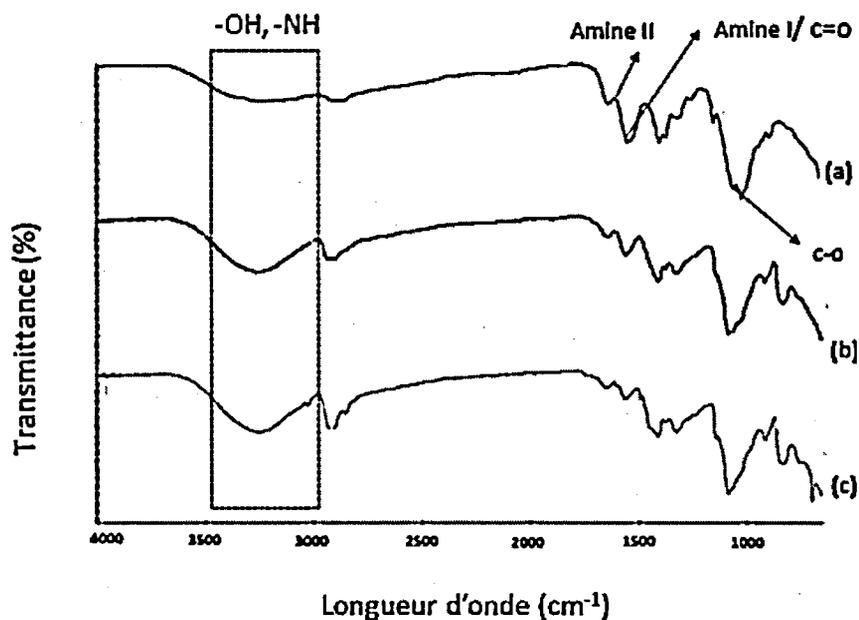
### 6.2.2 Analyse FTIR

La spectroscopie FTIR a été utilisée pour étudier la formation de réseaux réticulés dans les films composites. La **Figure 6.11** montre le spectres FTIR de chitosane comparé à ceux des films composites PVA-Ch (1-3) et (3-1).

La vibration d'étirement du groupe d'amide du film de chitosane apparaît à  $1560\text{ cm}^{-1}$ . Le film de PVA-Ch montre une modification du pattern caractéristique du spectre du chitosane ainsi que le décalage du pic dans une gamme de fréquences inférieures en raison de la liaison hydrogène entre le  $\text{-OH}$  du PVA et les  $\text{-OH}$  ou  $\text{-NH}_2$  du chitosane. La **Figure 6.11a** représente le spectre de chitosane pur présentant des absorptions à  $1650\text{ cm}^{-1}$  et  $1585\text{ cm}^{-1}$ , caractéristiques de la déformation N-H dans les amines primaires (Lambert *et al.*, 1998). La bande d'absorption de  $3450$  à  $3200\text{ cm}^{-1}$  est attribuée aux vibrations d'étirement O-H et N-H (Umesh *et al.*, 2011). Les bandes de transmission comprises entre  $1000$  et  $1100\text{ cm}^{-1}$  sont attribuées aux vibrations d'étirement C-O et C-N. Une bande autour de  $897$  et  $1152\text{ cm}^{-1}$  correspond à la structure du saccharide (Naveen Kumar *et al.*, 2010).

Les spectres IR du film composite PVA-Ch sont présentés à la **Figure 6.11b, c**. Les spectres de la **figure 6.11** étaient différents de ceux du chitosane.

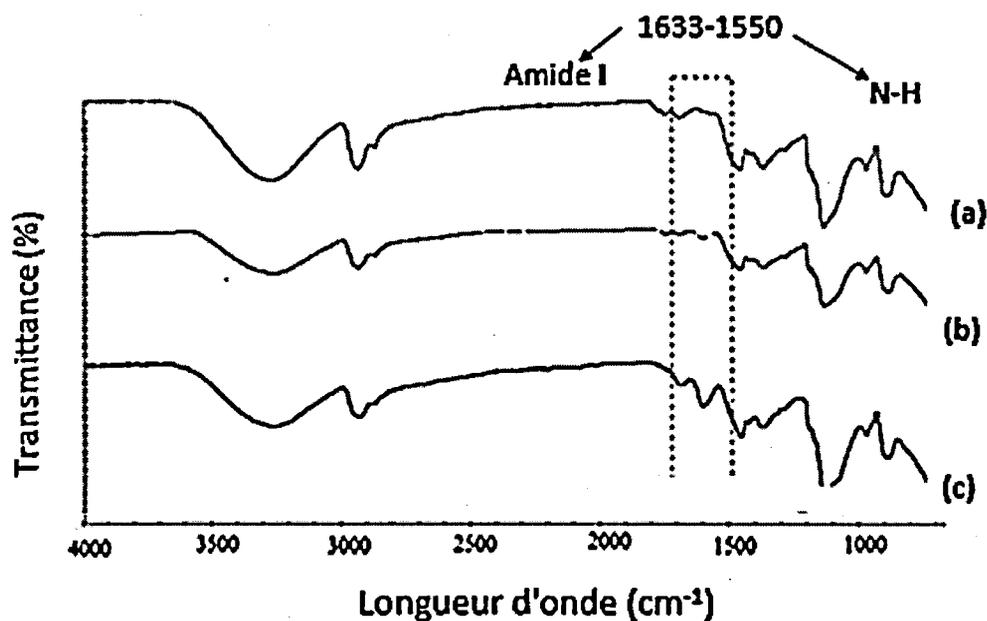
La **Figure. 6.12** présente les spectres IR des film composites PVA-Ch (3-1) avant réticulation et après réticulation avec Gp (0.05% m/v) dans les différents méthodes; M1 et M2. Il existe certaines différences dans les bandes d'absorption du PVA-Ch/réticulé par rapport à celles de non- réticulé, comme le prouvent les bandes de 1633 et 1550  $\text{cm}^{-1}$  (**Fig. 6.12**), respectivement liées aux groupes C=O et  $\text{NH}_2$ . La réticulation du chitosane implique une réaction rapide consistant en l'attaque nucléophile par le groupe amine du chitosane avec la génipine sur l'atome de carbone oléfinique en C-3 de la Gp, ce qui entraîne l'ouverture du cycle dihydropyrane et la formation d'une amine tertiaire, un dérivé de Gp lié à une unité de glucosamine.



**Figure 6.11** Spectres FTIR des films de PVA-Ch avec différents rapports des masses : (a) PVA-Ch (0-1) ; (b) PVA-Ch (1-3); (c) PVA-Ch (3-1).

L'étape suivante est la formation plus lente d'un amide par la réaction du groupe amine sur le chitosane avec le groupe ester sur le C-11 de la GP (Mi *et al.*, 2001) et les deux groupes chimiques nouvellement formés, à savoir l'amide monosubstitué et l'amine tertiaire (Muzzarelli, 2009). La bande à  $1633\text{ cm}^{-1}$  est attribué à l'étirement C-O chez les amides secondaires (Lambert *et al.*, 1998), visible sur la **Figure 6.12**. L'addition de la Gp implique une augmentation de l'intensité de l'amide à  $1633\text{ cm}^{-1}$ .

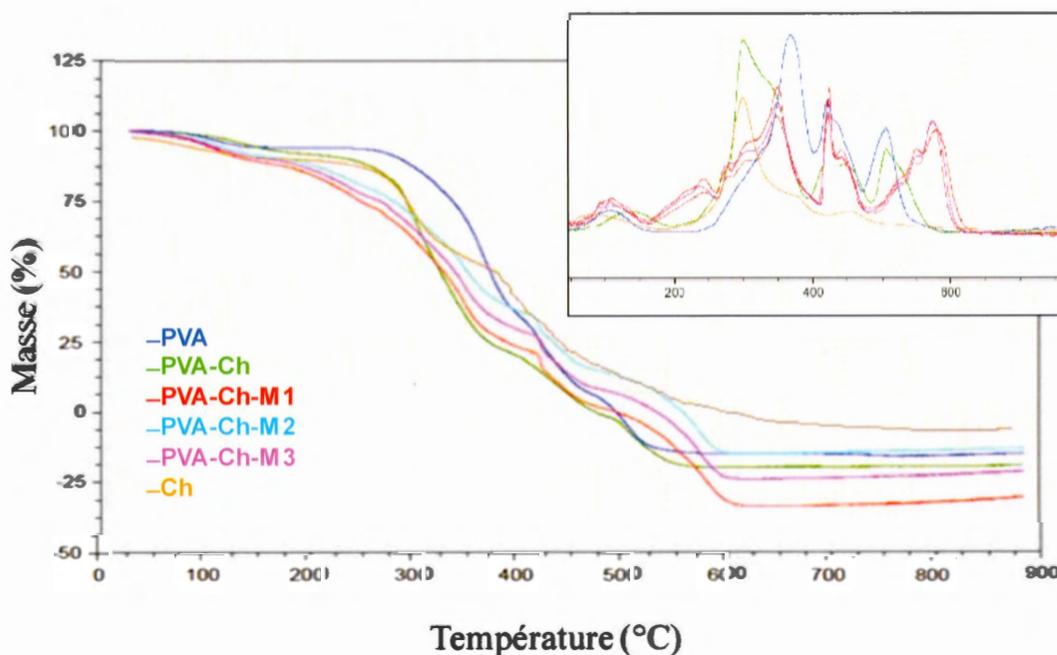
Tous les composites dérivés de chitosane ont montré une augmentation relative de leur bande amide (NH-CO) et une chute simultanée de la bande amine (-NH<sub>2</sub>) après réticulation chimique avec du GP (Umesh *et al.*, 2011). L'intensité du pic correspondant à amine primaire ( $1530\text{ cm}^{-1}$ ) décalage à l'amine secondaire avec la teneur en génipine (**Fig.6.12**) dans les films composites après réticulation.



**Figure 6.12** Spectres FTIR des différents films. PVA-Ch (3-1))(a), PVA-Ch/non réticulé, (b) PVA-Ch/M1 sans traitement avec Gp (Gp 0.05 % m/v) (c) PVA-Ch/M2 (Gp 0.05% m/v).

### 6.2.3 Analyse thermogravimétrique (TGA)

La stabilité thermique des films composites a été étudiée à l'aide de TGA (**Fig 6.13**). Il existe deux étapes de dégradation du chitosane. Dans la première étape, la perte de masse commence à environ 250 °C et continue jusqu'à environ 320 °C avec une perte de masse d'environ 50 %. La deuxième étape atteint son maximum à environ 410 °C avec un pourcentage de perte d'environ 40 %. La courbe TGA représentative du PVA-Ch non réticulés est très différente de celle des films composites PVA-Ch (réticulés), comme le montre la **Figure 6.13**.



**Figure 6.13** Courbes TGA (et les dérivées DTG, dans l'onglet) pour les films à base de PVA et Ch. Composites de PVA-Ch (3-1); PVA-Ch (non réticulé), PVA-Ch/M1, PVA-Ch/M2 et PVA-Ch/M3.

Les films présentent plusieurs étapes de perte de masse en raison de l'évaporation de l'eau et de la dégradation de la membrane de l'hydrogel. Au cours de la première étape, le film a perdu de la masse de 40 °C à 130 °C en raison de la vaporisation d'humidité du film. Aussi, à cette température, le chitosane aurait tendance à perdre de la masse (Diab *et al.*, 2012). Par conséquent, la première étape de la perte de masse du film a été causée par la vaporisation de l'eau et la perte de masse du la chitosane. Dans l'étape suivante, la masse des films a rapidement été diminuée de 130 °C à 250 °C probablement à cause du PVA, ce qui concorderait avec les données de (Srinivasa *et al.*, 2003). L'événement thermique entre 250 °C et 300 °C a indiqué une décomposition du chitosane.

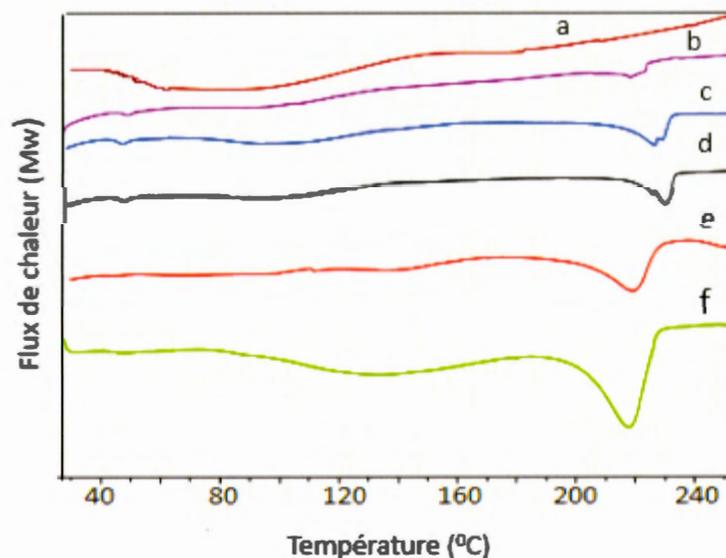
Lorsque la température a augmenté de 395 °C à 480 °C, la masse des films composite a rapidement diminué. Le dernier était compris entre 480 °C et 600 °C. La masse du film diminuait lentement, à côté du PVA et du Ch natif (Srinivasa *et al.*, 2003). La température maximale de décomposition (TMD) était de 568 °C pour PVA-Ch (non-réticulé), alors que la TMD pour PVA-Ch/M1 était de 575 °C, celles de PVA-Ch/M2 et PVA-Ch/M3 étaient 578 et 580 °C respectivement. Toutes les valeurs sont supérieures à la TMD du PVA natif (506 °C).

Il est à noter que les températures maximales des courbes TGA dans les régions de décomposition pour les films composites réticulés PVA-Ch sont différentes de celles du PVA-Ch non-réticulé avec l'augmentation des degrés de réticulant. Cela montre que les stabilités thermiques des composites PVA-Ch augmentent avec la présence de réticulants. Comme on peut le voir sur la **Figure 6.13**, il n'y a plus de différence entre les courbes de stabilité thermique des composites réticulés de formulation différente. La raison semble être la présence de chitosane (TMD : 398 °C) dans la composite.

La réticulation des composites de polymères peut améliorer la stabilité thermique et dans cette étude, la double réticulation a eu un effet considérable sur l'amélioration de la stabilité thermique des films composites.

#### 6.2.4 Analyse des films par calorimétrie différentielle à balayage

Afin d'étudier les effets de la stabilisation physique sur la structure du composite PVA/chitosane résultant, une analyse DSC a été réalisée et les thermogrammes DSC obtenus pour les films de PVA, Ch et des films composites (PVA-Ch) nonréticulés et réticulés sont illustrés sur la **Figure. 6.14**.



**Figure 6.14** Courbes de calorimétrie différentielle des films natif et composites PVA-Ch (3-1). (a) chitosane, (d) PVA, (e) PVA-Ch/non réticulé, (f) PVA-Ch/M1, (c) PVA-Ch/M2, (b) PVA-Ch/M3.

Les courbes DSC des échantillons montraient des pics endothermiques aux alentours de 60 à 240 °C correspondant à la température de fusion des polymères cristallins. La courbe DSC du film de chitosane montre un large pic endothermique à environ 79 °C. Le film de PVA présente un pic de fusion endothermique net à ~ 230 °C, tandis que le film de chitosane pur ne montre aucune transition de fusion car la plupart des polysaccharides ne fondent pas mais se dégradent lorsqu'ils sont chauffés à une

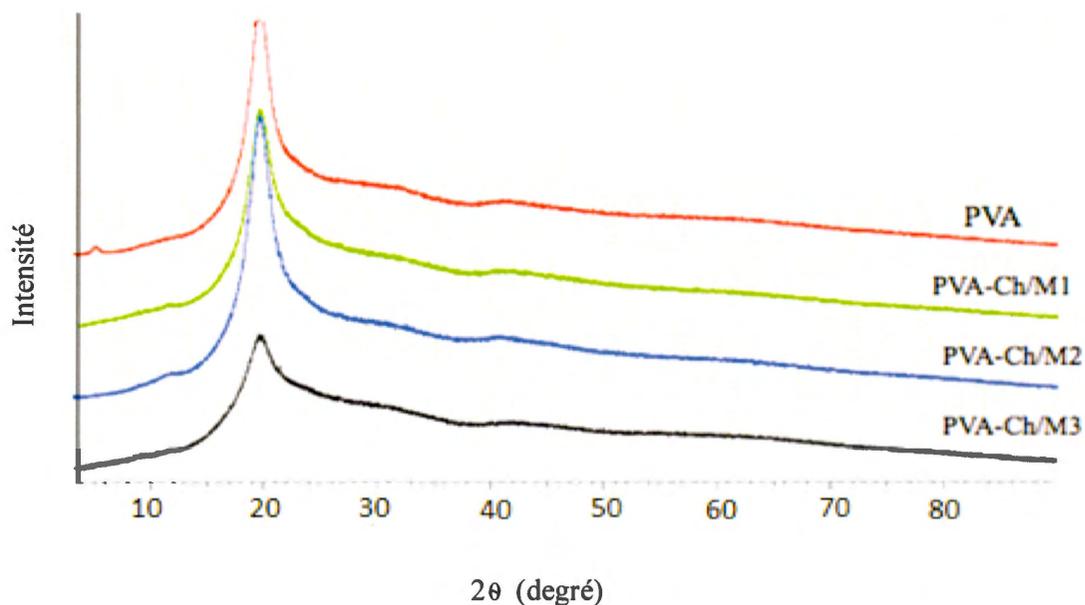
certaine température. Un examen plus approfondi de la **Figure 6.14** révèle qu'il existe des différences dans la surface du pic endothermique de tous les films.

La températures de fusion du film PVA en comparaison avec ceux des films PVA/Ch étaient significativement différentes. L'association de chitosane dans la structure de PVA réduit la stabilité thermique et conduit à une valeur inférieure du point de fusion, avec la diminution de la structure cristalline. Ces résultats indiquent que les films traités avec des agents de double réticulation (PVA-Ch/M2, PVA-Ch/M3) présentent une stabilité thermique supérieure à celle des non-réticulés (PVA-CH) et même avec un seul agent de réticulation (PVA-Ch/M1).

#### 6.2.5 Diffraction des rayons X

Les diagrammes de diffraction des rayons X pour les films de PVA, PVA-Ch, PVA-Ch/M1, PVA-Ch/M2 et PVA-Ch/M3 (réticulés avec Gp 0.05 % m/v et STMP 1% m/v) sont illustrés à la **Figure 6.15**. Le film de PVA est semi-cristallin. Le diffractogramme a montré un pic typique avec une intensité à  $2\theta = 20.10^\circ$  et un pic d'épaule inférieure autour de  $2\theta = 42.52^\circ$  accordant avec des étude de Guriguis (Guiriguis et Moselhey, 2012). Après avoir combiné le PVA au Ch, les profils de diffraction des films composites ont montré une intensité plus faible du pic à  $2\theta = 19.87^\circ$ , ce qui indique que la cristallinité du PVA-Ch est inférieure à celle du film PVA. Les diffractogrammes PVA-Ch et PVA-Ch/M1 ont montré aussi un pic diffus caractéristique à l'état amorphe à  $2\theta = 42.22^\circ$  (De Souza *et al.*, 2009).

Les résultats du diffractogramme PVA/Ch/M3 indiquent l'intensité du pic cristallin à ( $2\theta = 20^\circ$ ) diminuée et élargie avec l'ajout de génipine à la STMP comme co-réticulant, de la matrice polymérique. De plus, sa cristallinité a diminué avec l'augmentation de degré de réticulant du film PVA-Ch (Cho *et al.*, 1999).



**Figure 6.15** Diffractogrammes des différents films de PVA, PVA-Ch/M1, PVA-Ch/M2, PVA-Ch/M3 (1 % v/p STMP et 0.05 % v/p GP).

Les résultats montrent que les films ont perdu la cristallinité après réticulation et association au chitosane. Enfin, la XRD a soutenu l'amélioration des propriétés mécaniques des films de PVA-Ch en raison de la réticulation de la matrice

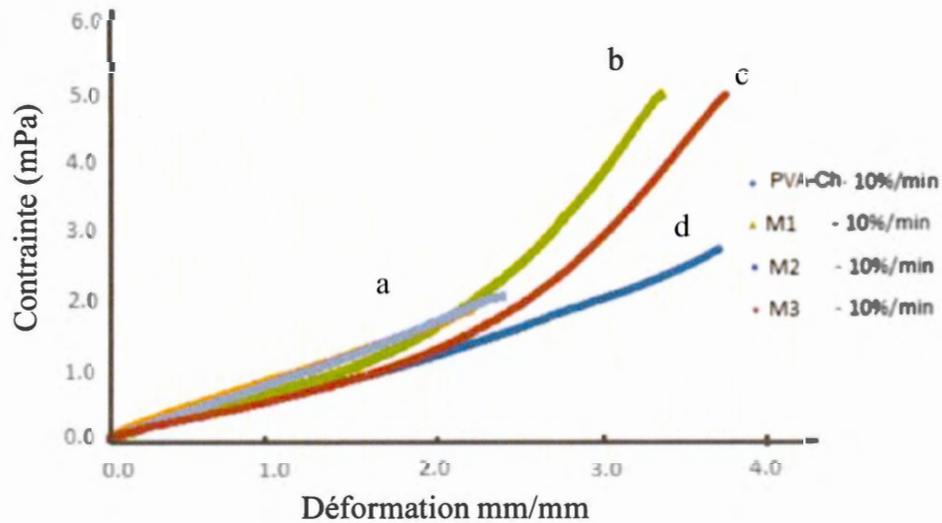
#### 6.2.6 Propriétés mécaniques

La combinaison de PVA et chitosane peut contribuer à améliorer les propriétés mécaniques du nouveau composite ainsi que probablement via des liaisons hydrogène entre les groupes hydroxyle du PVA et les groupes amine et hydroxyle du chitosane et possiblement par d'autres interactions intermoléculaires (Tripathi *et al.*, 2010). La **Figure 6.16** montre l'effet du degré de réticulation sur les propriétés mécaniques du PVA-Ch. Le module est connecté à l'énergie de liaison des atomes. La pente raide de la courbe de contrainte- déformation ( en anglais :strain-stress) indique un module d'élasticité élevé, ce qui signifie que des forces importantes sont nécessaires pour séparer les atomes, permettant l'étirement élastique du matériau (Park *et al.*, 2001).

Dans les composites, la rigidité est proportionnelle au module de Young. La **Figure 6.16** montre une relation contrainte-déformation non linéaire, et que la rigidité augmente au fur et à mesure que la réticulation augmente. Ce résultat est clairement montré (**Fig. 6.16**), les films PVA-Ch /M1 et PVA-Ch /M3 présentent à des valeurs de contrainte déformations plus élevées.

Les films composites entraînent une interaction intermoléculaire entre le chitosane et le PVA via la formation de liaison hydrogènes, ce qui améliore la résistance mécanique des matrice. L'addition de STMP et de génipine comme réticulants a affecté les propriétés mécaniques du film composite; il y a une diminution du pourcentage d'allongement et une augmentation de la résistance à la traction. La résistance à la traction des films, PVA-Ch non- réticulé est passée de 2.64 à 4.78 pour le PVA-Ch/M1, à 2.99 pour le PVA-Ch/M2 et à 4.76 pour le PVA-CH/M3. D'après les résultats, la réticulation améliore les propriétés mécaniques du polymère composite, ce qui est conforme aux autres publications (Abraham *et al.*, 2016; De Souza *et al.*, 2009; Umesh *et al.*, 2011).

L'épaisseur, la résistance à la traction, l'allongement maximal à la rupture et le module d'élasticité des films sont résumés dans le **Tableau 6.4**. Les propriétés mécaniques des films peuvent être définies en termes de module de Young, pourcentage d'allongement, résistance à la traction et résistance au déchirement. Les polymères mous présentent une faible résistance à la traction, un faible allongement à la rupture et un faible module de Young, alors que les polymères durs et résistants présentent une résistance élevée à la traction, un allongement à la rupture élevé et un module de Young élevé (Karki *et al.*, 2016).



**Figure 6.16** Courbe contrainte-déformation pour les différents films. PVA-Ch non réticulé (a), et réticulé; PVA-Ch/M1 (b), PVA-Ch/M3 (c) et PVA-Ch/M2 (d)

Le module de Young du film réticulé de PVA-Ch n'a pas augmenté par rapport au film non réticulé. Par conséquent, à partir des données sur le module d'élasticité (**Tableau 6.4**), on peut conclure que notre film composite est élastique et dur.

Les films réticulés de PVA-Ch évalués ont montré un fort comportement plastique et n'ont pas montré de défaillance en rupture. Ce comportement fortement plastique permettrait certainement aux films de conserver une intégrité structurale et une continuité sous des contraintes externes anormales. Cependant, les films peuvent être déformés plastiquement avec une facilité relative. Ainsi, un film ayant une résistance à la traction adéquate peut être souhaitable pour réduire le risque de rupture du film sous une contrainte modérée, car des modifications de la surface du film peuvent altérer le taux de perméabilité du médicament.

**Tableau 6.4 L'épaisseur, la résistance à la traction, l'allongement maximal à la rupture et le module d'élasticité des films.**

Formulation	Épaisseur (µm)	Force tensile (mPa)	Élongation (%)	Module (mPa)
PVA-Ch	229 ± 7.70	2.64 ± 0.34	370 ± 20.5	0.64 ± 0.14
PVA-Ch/M1	104 ± 5.41	4.78 ± 0.66	335 ± 25.4	0.65 ± 0.12
PVA-Ch/M2	124 ± 6.53	2.99 ± 0.23	240 ± 21.2	0.76 ± 0.14
PVA-Ch/M3	143 ± 1.24	4.76 ± 0.55	274 ± 18.6	0.55 ± 0.16

### 6.2.7 Absorption de fluide

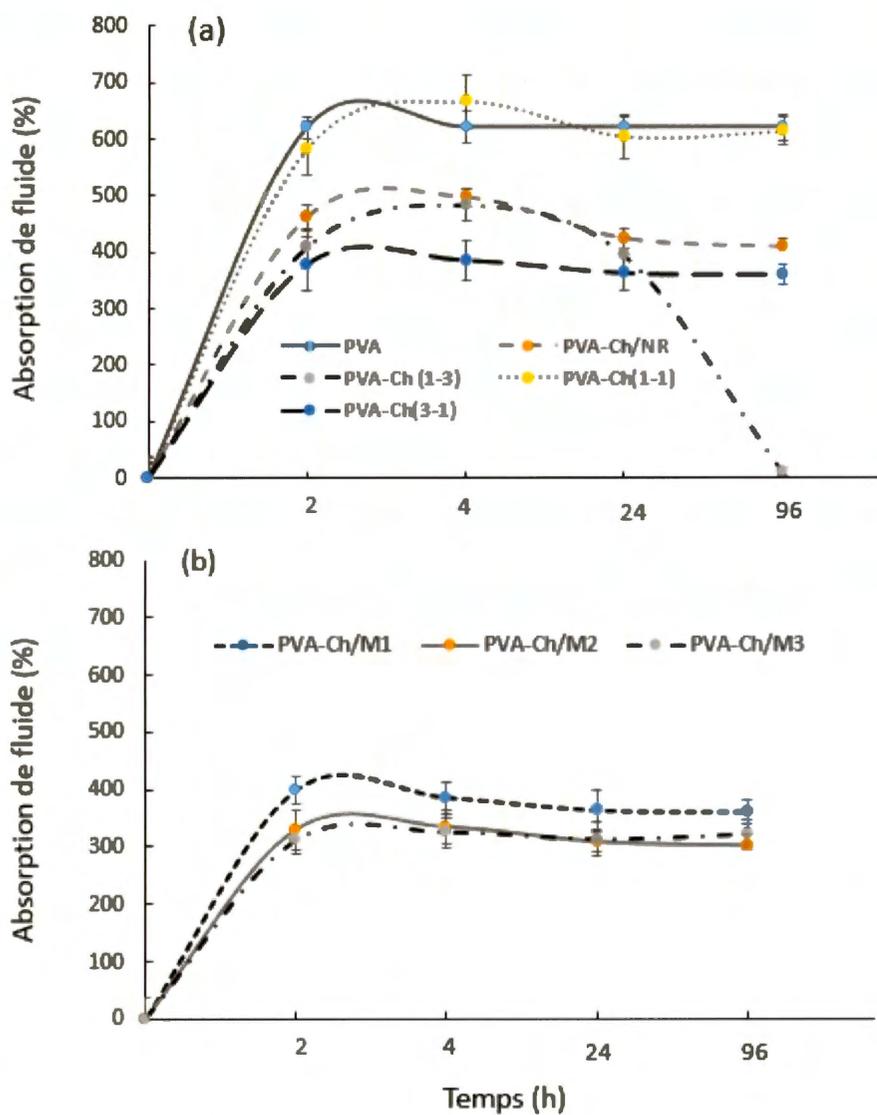
Selon la théorie de Donnan 1924, le phénomène de gonflement devait être un équilibre du gradient de pression osmotique ou du gradient de concentration entre l'intérieur du hydrogel et la solution externe (Donnan, 1924). En plus de la pression osmotique, le gonflement des hydrogels déterminé par une force de répulsion électrostatique (fournie par les groupes chargés) contribue à l'expansion du réseau de gel. Si ce gonflement est généré par ionisation des groupes fonctionnel, un tel hydrogel est sensible au pH (Gunasekaran *et al.*, 2006). En fait, à la fois la répulsion des monomères de Van der Waals et la pression osmotique des contre-ions serait diminuée qui conduisent à une compression plus importante avec un plus petit gonflement latéral.

L'absorption de fluide par les films PVA, Ch et les composites PVA-Ch (avec différents rapports de polymères et réticulés avec STMP et génipine) a été évaluée. Le comportement d'absorption de fluide des polymères dépend de la nature du milieu et des polymères tels que les groupes hydrophiles, la densité des liaisons de réticulation, le pH et la température du milieu. Par conséquent, tout changement dans le réseau des structures des films polymériques pourrait affecter directement son comportement de gonflement. Un comportement typique de l'absorption de fluide pour le film PVA et les composites de PVA-Ch (3-1), (1-1) et (1-3) avant la réticulation est présenté à la

**Figure 6.17a.** Le film PVA a présenté une augmentation de masse initiale rapide à cause de l'absorption de leau après deux heures, suivie par une stabilisation de la masse sur 96 h.

Le chitosane natif a présenté une absorption d'eau plus élevée au cours de la première heure d'incubation et au bout de deux heures, il est devenu gel (données non présentées). La **Figure 6.17a** montre que le comportement de gonflement est notamment influencé par la teneur en chitosane du composite. De plus, l'augmentation de la teneur en chitosane dans la matrice augmentait remarquablement la capacité de gonflement, du fait de la présence de groupes plus hydrophiles dans les réseaux. Probablement en raison des groupes ionisés tels que l'amine dans le réseau de Ch, induisant une répulsion électrostatique supplémentaire entre ces groupes et conduit à un gonflement du gel. Le PVA-Ch (3-1) présentait un pourcentage d'absorption de fluide inférieur à celui des autres composites; par conséquent, il a été sélectionné comme la formulation candidate pour le reste des tests.

La **Figure 6.17b** montre le comportement du fluide pour le PVA-Ch (3-1) avant et après la réticulation avec STMP (1% m/v) et GP (0.05 % m/v) dans différentes formulations. Ces résultats ont révélé une influence significative de la réticulation sur le taux d'absorption de fluide qui était près de 500 % pour PVA-Ch avant réticulation, est près de 400 % , 350 % et 325% après réticulation selon les trois méthodes (M1,M2,M3) respectivement. Ce phénomène pourrait être dû à un réseau plus rigide intramoléculaires et des réactions intermoléculaires entre les deux chaînes de polymères. Après réticulation et formation de liaisons covalentes entre les chaînes, la flexibilité du film diminue de manière conséquente.



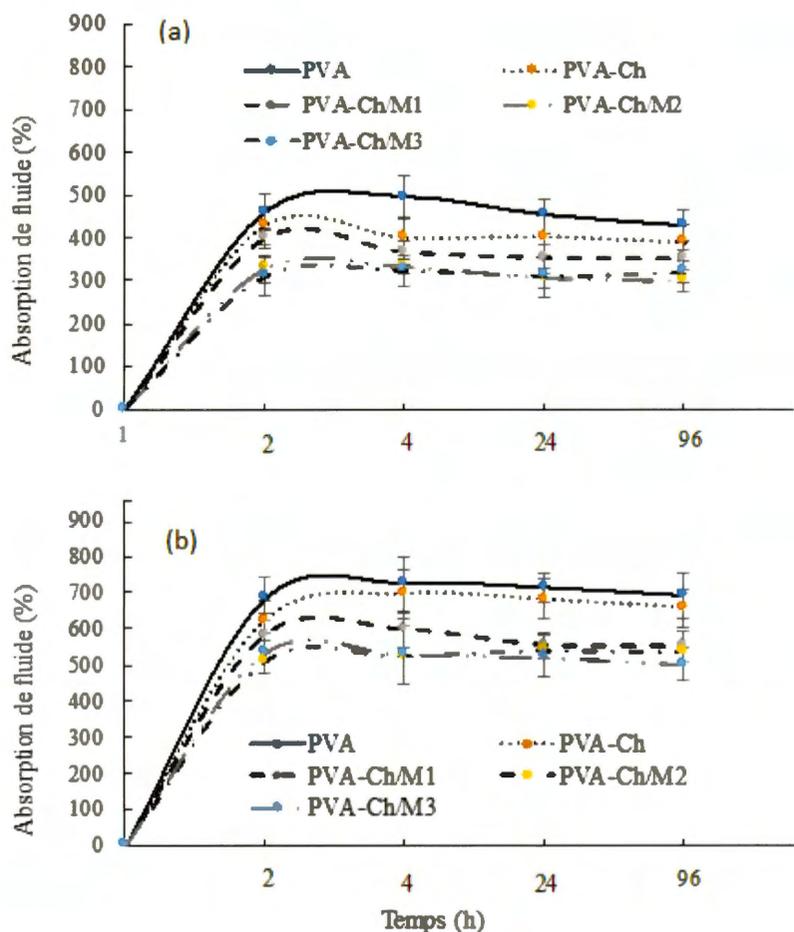
**Figure 6.17** Taux d'absorption d'eau pour des films de PVA et de PVA-Ch à 37 °C et pH 7.2 pendant 96 h; a) PVA, PVA-Ch/NR (non réticulé), PVA-Ch (1-3), PVA-Ch (1-1) et b) PVA-Ch (3-1) réticulé: PVA-Ch/M1, PVA-Ch/M2 et PVA-Ch/M3.

L'altération structurale a entraîné une diminution du taux de gonflement. Par conséquent, ces résultats correspondent à la structure du film attendu, où les groupes hydrophiles enfouis du réseau de polymères défavoriseront l'absorption d'eau. La

réticulation limite la diffusion de l'eau et diminue le taux de gonflement. La présence des ponts de réticulation tels que ceux avec la GP fermerait les pores du réseau de l'hydrogel; par conséquent, le polymère réticulé ne pouvait pas absorber des molécules d'eau. Dans un environnement neutre ou basique, les groupes amines du chitosane sont déprotonés et la répulsion électrostatique est affaiblie, ce qui nuit aux caractéristiques de gonflement. Globalement, la différence dans les modèles de réticulation (M1, M2, M3) n'a pas significativement influencé le taux d'absorption de fluide des composites de polymères.

L'absorption de fluide du film composite PVA-Ch (3-1) avec des diverses méthodes de réticulation dans un tampon pH (2.1) et dans un tampon (PBS) à pH (7.2) est illustrée à la **Figure 6.18**. Dans les hydrogels préparés, le gonflement dépend du pH, ce qui pourrait être attribué aux groupes fonctionnels ionisables.

En règle générale, le PVA présente une forte interactivité avec l'eau en raison des groupes hydroxyles (Fumio *et al.*, 1990). Tous les polymères ont montré le maximum d'absorption de fluides après 2 h et les films étaient plus ou moins constants jusqu'à 96 h. Le PVA a la plus forte absorption d'eau par rapport aux PVA composite (**Fig. 6.18a**). Le chitosane a présenté une absorption d'eau plus élevée au cours de la première heure d'incubation et au bout de deux heures, pris forme de gel (données non présentées). Par ailleurs, les films réticulés (PVA-Ch) présentaient une capacité de gonflement plus faible (270 à 387 %) comparés aux films PVA-Ch non-réticulé (420 %). Ces résultats indiquent que la réticulation dans les polymères provoque une compaction chez les films, attribuable à l'augmentation des liaisons covalentes. Ceci explique pourquoi le gonflement des films provenant des méthodes M2 et M3 (co-réticulé), était moindre par rapport à ceux de la méthode M1.



**Figure 6.18** Absorption de fluides à différents pH par les films. Absorption de fluide en fonction du temps pour PVA, PVA-Ch (3-1), PVA-Ch/M1, PVA-Ch/M2 et PVA-Ch/M3 à pH 7.2 (a) et pH 2.1 (b).

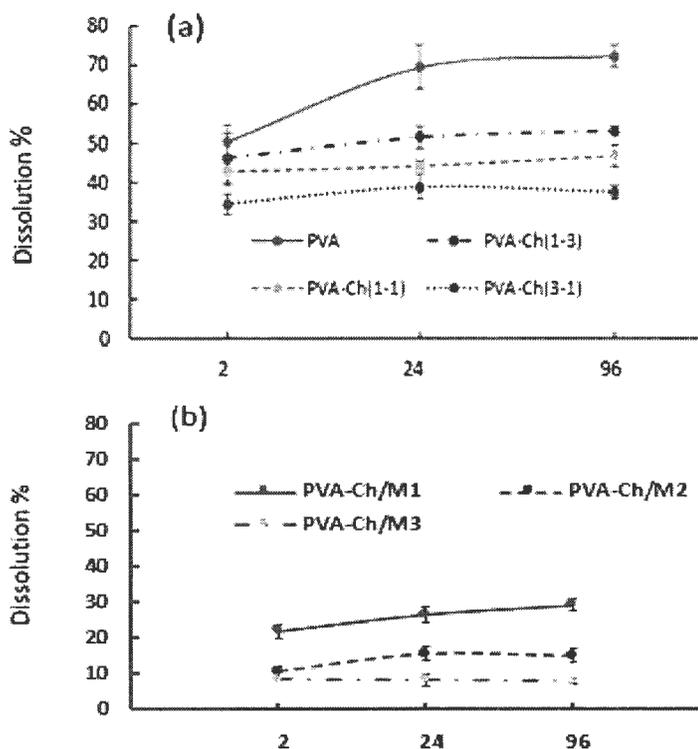
L'effet du pH 2.1 sur le gonflement des films est illustré à la **Figure 6.18b**. À un pH inférieur ( $<6.3$ ), les groupes amine primaire de Ch sont ionisés; les groupes  $\text{NH}_3^+$  chargés positivement sont répartis dans le réseau d'hydrogel (Gunasekaran *et al.*, 2006). Cette charge positive fournit également des forces de répulsion électrostatiques qui contribuent au gonflement du réseau. Les films non-réticulés (PVA-Ch) dans le milieu acide présentaient une capacité de gonflement plus élevée (450 à 605 %) comparé au PVA-Ch réticulé (270 à 387 %) dans un pH neutre. À pH 2.1, la concentration en ions

$H^+$  est suffisamment élevée pour ioniser  $NH_2$ . Cela pourrait être due au fait qu'en milieu acide, les groupes amino du Ch ( $-NH_2$ ) sont protonés ( $-NH_3^+$ ), de sorte que les liaisons hydrogène entre le PVA et le chitosane sont inhibées et que le réseau du gel a davantage tendance à se lier par pont hydrogène au fluide environnant.

Avec des valeurs de pH descendant, dans la plage acide, les taux de gonflement de tous les hydrogels ont été augmentés. Inversement, les taux de gonflement diminuaient lorsque les valeurs de pH du PBS étaient supérieures à 6.0. En effet, de nombreuses liaisons hydrogènes sont générées par les groupes  $NH_3$  déprotonés dans des conditions basiques, ce qui renforcerait leurs structures du réseau et achèverait à la diminution des taux de gonflement des films (Fan *et al.*, 2016).

#### 6.2.8 Comportement de dissolution (désintégration)

La désintégration du polymère se produit lorsque les chaînes macromoléculaires sont rompues sous l'influence de l'énergie thermique, mécanique ou chimique, quand le polymère peut perdre ses propriétés physiques et chimiques (McCoy et Madras, 1997). Le signe le plus évident de dissolution après dispersion dans la solution est la perte de masse et la détérioration des propriétés mécaniques du polymère. La **figure 6.19** présente le résultat typique du comportement de désintégration des films PVA et PVA-Ch en utilisant la méthode d'immersion dans PBS (pH 7.2). Le taux de désintégration du film composite PVA-Ch était plus lent que le film du PVA. Les résultats montrent que le comportement de désintégration est particulièrement affecté par la teneur en chitosane dans la matrice: la masse du polymère était réduite proportionnellement la teneur en chitosane, atteignant une valeur minimale avec PVA-Ch (3-1).



**Figure 6.19** Courbes de dissolution pour différents films à 37 °C et à pH 7.2 pendant 96 h. (a) Taux de dissolution des films de PVA, PVA-Ch (1-3), (1-1) et (3-1) (b) Taux de dissolution des films de composites de PVA-Ch (3-1) selon différentes méthodes de réticulation (M1, M2, M3).

Le degré de dissolution des films ont été réduits de 45 % (film PVA) à 41 % (film PVA-Ch/1-3) à 37 % (film PVA-Ch/1-1) à 30 % avec (film PVA-Ch/3-1). La dissolution du film à base de composite avec des liaisons covalentes est beaucoup plus difficile que celle du non-composite (PVA ou Ch), expliquée par les liaisons covalentes faisant la différence. Ensuite, le PVA-Ch (3-1) avec une vitesse de dissolution minimale a été sélectionné pour évaluer l'effet de réticulation chimique sur le comportement de la dissolution. La **Figure 6.19b** montre que la vitesse de dégradation du PVA-Ch réticulé avec la GP par les trois méthodes différentes est plus lente que

celle du PVA-Ch non- réticulé. Une désintégration plus lente pourrait être due aux interactions entre GP et le groupe amine du chitosane induites par la réticulation chimique (Berger *et al.*, 2004). Cela est probablement liée à la réaction de réticulation et à la formation d'une structure rigide fondée des chaînes de film PVA-Ch, réduisant considérablement leur vitesse de dissolution. Par conséquent, le film composite avec co-réticulation (M2 et M3) présentait le taux de désintégration minimal par rapport au composite avec un seul réactif de réticulation (M1). Cette observation est en accord avec la littérature qui rapporte que la réticulation diminuait la vitesse de dissolution des polymères ou des polymères composites (Ducharme *et al.*, 2010; Spagnol *et al.*, 2012). La présente étude menée sur le PVA-Ch a révélé que tous les films composites contenant du chitosane avaient une capacité d'absorption d'eau plus élevée dans un environnement acide (résultat non présenté) que dans un environnement basique, principalement en raison de la présence des groupes amines.

#### 6.2.9 Dosage de biocompatibilité

La viabilité cellulaire est un paramètre important pour déterminer la biocompatibilité des hydrogels utilisés pour des applications biomédicales. La viabilité cellulaire a été mesurée à l'aide du test MTT. Le test évalue la faculté des enzymes mitochondriales actives présentes dans une cellule, capables, de réduire le MTT (Mansur *et al.*, 2008). Dans cette étude, le test de viabilité a été mesuré 48 h après l'ensemencement cellulaire.

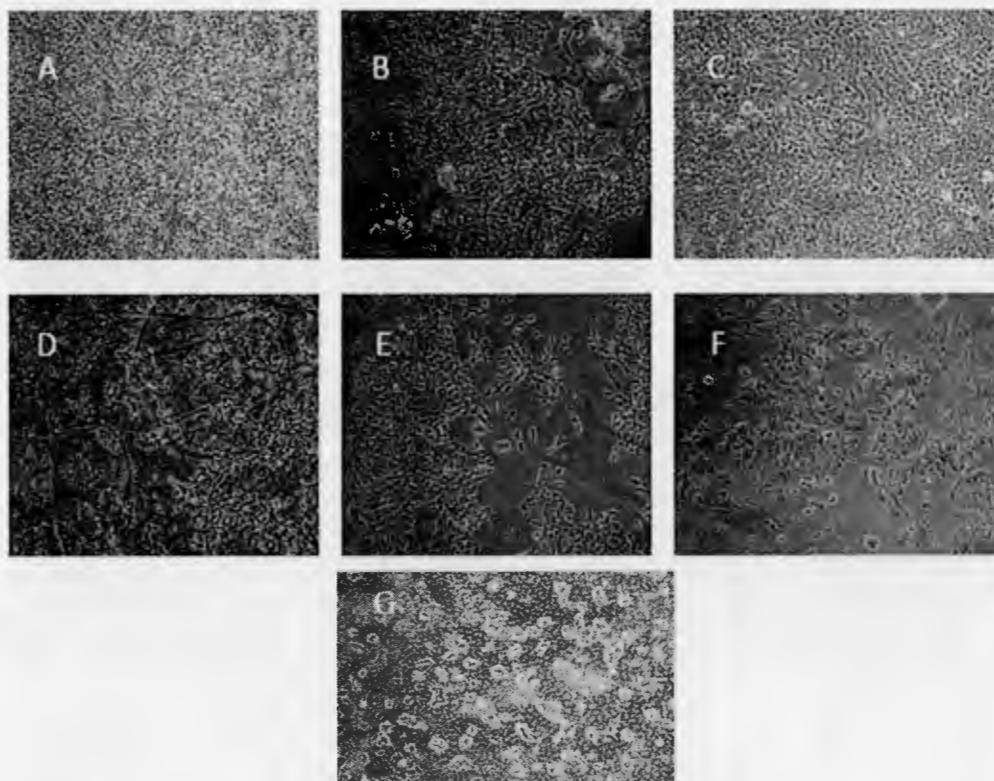
Le test de biocompatibilité a été réalisé en présence de films de PVA, Ch, PVA-Ch (3-1) obtenu avec les différentes méthodes de réticulation (M1, M2, M3) et avec des concentrations différentes d'agent de réticulant : la gènipine (0.01, 0.05, 0.1% m/v) et la concentration en STMP était toujours constante (1 % m/v).

Afin d'évaluer la capacité des films de retenir et de livrer le médicament, le complexe [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] a été immobilisé dans des films de PVA-Ch (3-1) réticulé avec des différentes méthodes de réticulation. Après 48 h d'incubation sur les matrices

polymères de PVA-Ch/M2, PVA-Ch/M3 et PVA-Ch/M2/0.05% Gp/[Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], les cellules ont adopté des modifications morphologiques pour tolérer l'interface, du matériau de croissance. De nombreuses cellules sont vivantes et visibles (Fig. 6.20). Il est à noter que plusieurs facteurs peuvent être affectés lors de la culture cellulaire sur les membranes. Cela suggère que les films de PVA-Ch présentaient de bonnes surfaces pour la culture de cellules P19.

À partir des essais au MTT, la viabilité des cellules en présence des matrices de PVA-Ch (réticulées ou non) a été évaluée. Les films composites ont présenté une biocompatibilité comparable. Selon l'évaluation biologique des dispositifs médicaux « essais de cytotoxicité *in vitro* » (Li *et al.*, 2015) des échantillons présentant une viabilité cellulaire supérieure à 75 % peuvent être considérés comme non cytotoxiques. La figure 6.21a montre que la viabilité des cellules varie entre environ 30 % et 95 % par rapport au témoin 100 %. Le nombre de cellules sur le film de PVA s'est avéré inférieur à celui sur le film de PVA-Ch/ non-réticulé. De plus, le nombre de cellules sur le film de PVA-Ch réticulé avec 0.05 % de génipine était significativement supérieur à celui sur le film de PVA-Ch. Les données ont montré qu'approximativement 70 à 90 % des cellules adhéraient au composite réticulé PVA-Ch (par rapport au témoin (gelatin sans treatment) 100%), mais seulement environ 40 % des cellules adhéraient au PVA-Ch non réticulé (par rapport au témoin 100%).

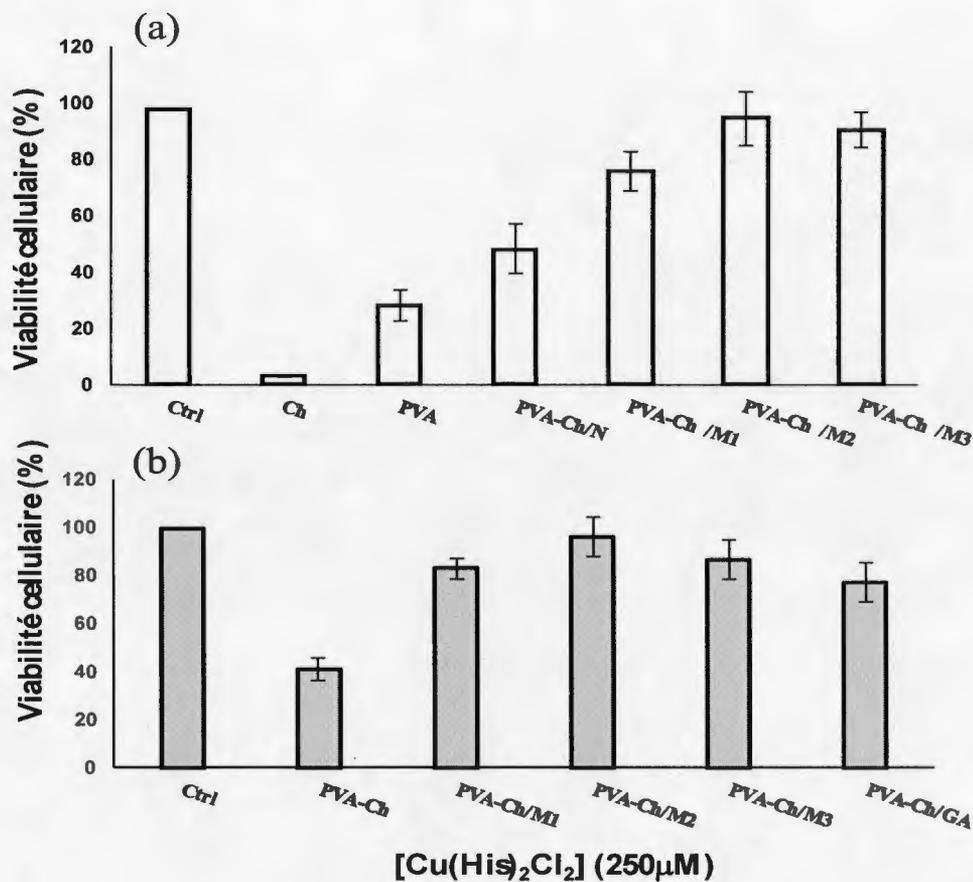
La faible viabilité est attribuée à la perméation des constituants des polymères (non réticulés) dans les milieux des cellules, dont les sels et le pH, car ils n'ont pas été neutralisés dans des films de PVA-Ch / non réticulé. Cependant, les films composites de PVA-Ch, après réticulation, ont été séparés, filtrés et neutralisés. Par conséquent, ces films présentaient une meilleure biocompatibilité.



**Figure 6.20** Micrographies des cellules P19 en culture avant (A, témoin) et après ensemencement sur les composites polymères: B) PVA-Ch/M2 (0.1 % p/v génipine), C) PVA-Ch/M2 (0.05 % p/v génipine), D) PVA-Ch/M2 (0.01 % p/v génipine), E) PVA-Ch/M3 (0.05 % p/v génipine), F) PVA-Ch/M2/[Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] G) PVA-Ch/M2/CuCl<sub>2</sub>

La **figure 6.21b** présente la viabilité des cellules sur des films de PVA-Ch avec des différentes méthodes de réticulation (M1, M2, M3) et le film PVA-Ch réticulée avec du glutaraldéhyde (GA) avec immobilisation de cuivre(II)-histidine. Les cellules sur le film PVA-Ch non-réticulé présentent environ 50 % de viabilité tandis que le film PVA-Ch réticulée présente 90 %. La viabilité cellulaire sur film de PVA-Ch/B/M2 réticulé avec du glutaraldéhyde présentait d'environ 80 % mais moins que le PVA-Ch/B/M2 réticulé avec de la génipine (95 %). La viabilité cellulaire sur des films PVA-

Ch/M2/M3 à différentes concentrations de génipine (0.01, 0.05, 0.1 % p/v) a été évaluée (Fig. 6.21a).



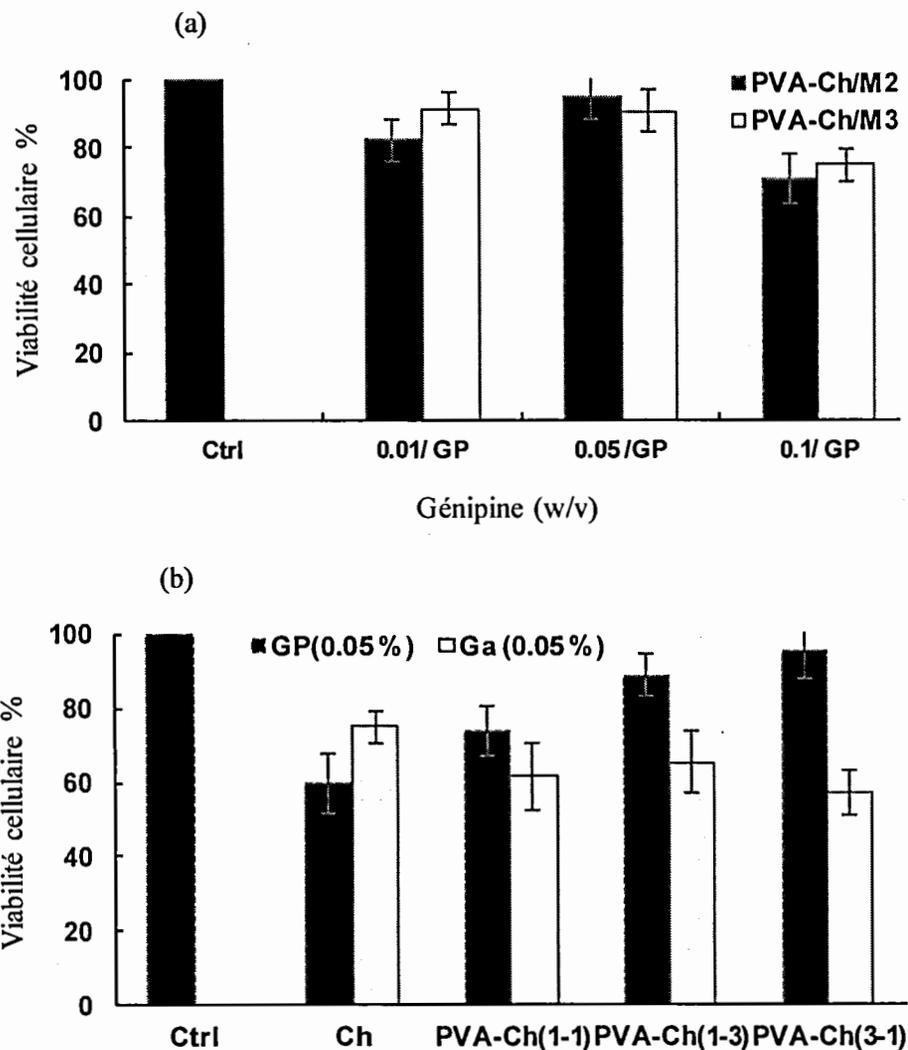
**Figure 6.21** La viabilité cellulaire en présence de PVA-Ch (3-1) (réticulé ou non), chargé avec [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (250µM). Les cellules P19 ont été incubées pendant 48 h en présence de chaque composé, et leur viabilité a été évaluée par le test MTT, et indiquée relativement aux cultures témoins (pas de composé). (a) Viabilité cellulaire en présence de chitosane, de PVA-Ch/N (non-réticulé) et réticulé avec des différentes méthodes de réticulation (M1, M2, M3) avec une concentration de génipine de 0.05 % m/v (b) Viabilité cellulaire en présence de PVA-Ch (3-1) avec immobilisation de cuivre(II)-histidine (250µM) dans différentes méthodes des films composites (M1, M2,

M3), PVA-Ch (non réticulé) et PVA-Ch /GA (réticulé avec du glutaraldéhyde). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM (n = 3).

Les résultats ont révélé que la biocompatibilité des films composites à différentes concentrations de GP était supérieure à 70 %. Ainsi, selon l'évaluation biologique des dispositifs médicaux d'après la norme ISO 10993-5 (Li *et al.*, 2015), les membranes étaient considérées comme non-toxiques. Les cellules cultivées sur le film PVA-Ch (génipine à 0.05 % m/v) permeattaient une meilleure viabilité cellulaire (environ 85 à 95 %) par rapport aux deux autres concentrations (0.01 et 0.1 % m/v) de la génipine. En conclusion, les films de PVA-Ch/GP n'étaient pas toxiques pour les cellules P19 et présentaient une bonne biocompatibilité pour les applications biomédicales (Christopherson *et al.*, 2009). La génipine en tant que réactif naturel a une toxicité inférieure à celle d'autres réactifs courants tels que le glutaraldéhyde.

La **figure 6.22** montre la viabilité cellulaire des cellules P19 sur les films de Ch, PVA-Ch (1-3), (1-1) et (3-1) en présence de différents réticulants (génipine et glutaraldéhyde). Le PVA a été réticulé avec STMP (1 % m/v) et Ch a été réticulé avec la génipine ou le glutaraldéhyde (0.05 % m/v) séparément. En bref, les résultats d'un composite typique de PVA-Ch (3-1) après réticulation se sont révélés relativement biocompatibles avec la culture à l'étude. Les films composites réticulés avec la génipine présentaient une compatibilité plus élevée avec les films réticulés par le glutaraldéhyde. Avec une légère augmentation de la compatibilité car la teneur en chitosane diminuait. Tous les échantillons réticulés avec la génipine ont présenté plus de 75 % de viabilité par rapport au témoin de référence. Ces résultats ont montré que la génipine, en tant qu'agent de réticulation, avait une toxicité inférieure à celle du glutaraldéhyde.

Il existe de nombreux facteurs pour contrôler les interactions cellulaires avec le réactif de biomatériau dont le gonflement, le pH, la température et la réticulation (Mathews *et al.*, 2008). De plus, une certaine rigidité de la membrane est impérative pour supporter les contraintes causées par la déformation et l'aplatissement des cellules.



**Figure 6.22 Viabilité cellulaire en présence des films PVA-Ch (3-1)/ M2 et de PVA-Ch (3-1)/ M3 à des concentrations différentes de génipine (0.1, 0.05, 0.01 % m/v) (a) Viabilité cellulaire en présence des films Ch, PVA-Ch (1-1), PVA-Ch (1-3) et PVA-Ch (3-1) avec différents réticulants : génipines (GP) et glutaraldéhyde à 0.05 % m/v (b) Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM (n = 3). Le contrôle est la surface de la gélatine (2% m/v).**

La taille des cellules par rapport à la porosité des membranes est un autre facteur déterminant pour contrôler l'adhésion et la croissance des cellules (Chuang *et al.*, 1999). Les résultats de cellulesensemencées sur des membranes de PVA-Ch suggèrent que ces membranes sont non toxiques et biocompatibles, en accord avec des études apparentées (Zhuang *et al.*, 2012).

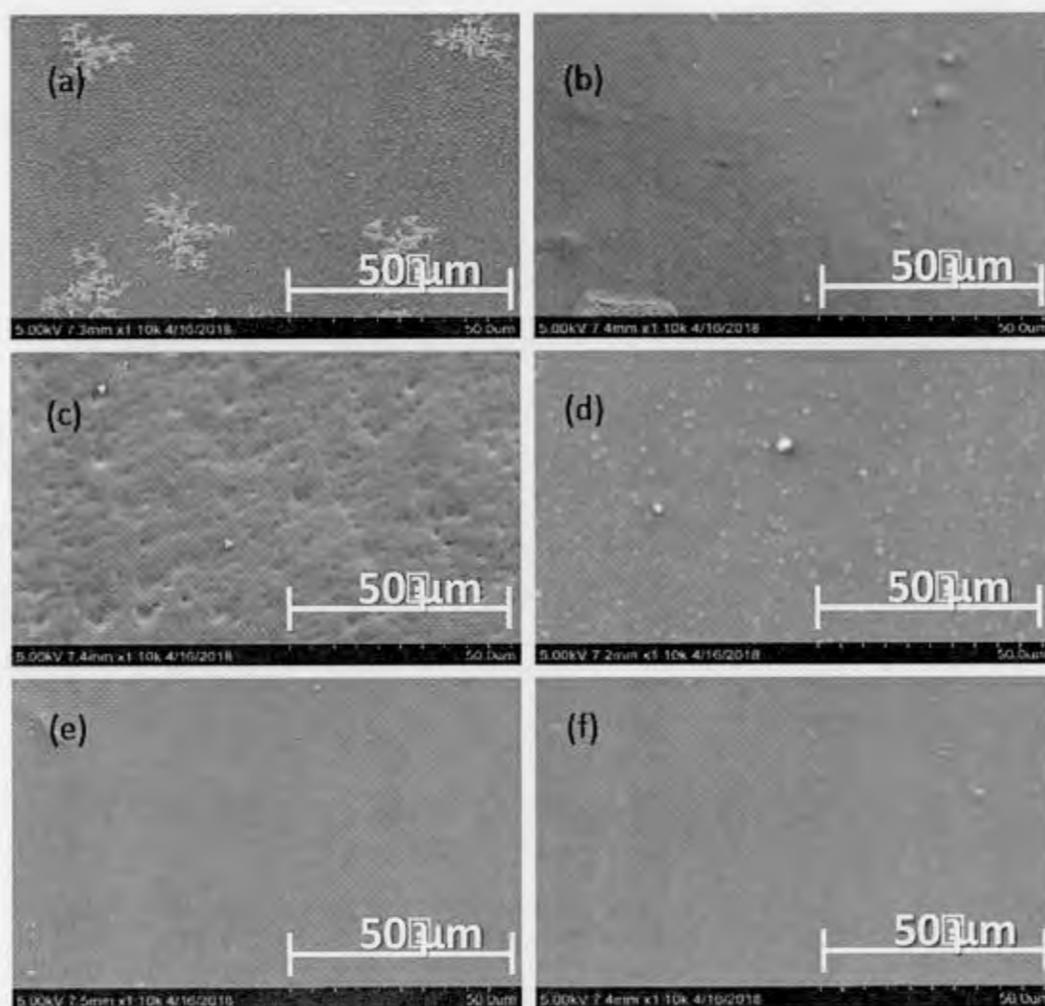
### 6.3 Films composites à base d'alcool polyvinylique et de chitosane modifiés par co-réticulation pour la libération contrôlée des médicaments

#### 6.3.1 Microscopie électronique à balayage (MEB)

La **Figure 6.22** montre les micrographies de surface des films PVA (a), de chitosane (b), de PVA-Ch/non réticulé (c), PVA-Ch/M1 (d), PVA-Ch/0.05%GP/M2 (e), PVA-Ch/0.05%GP/M3 (f). La surface des films de chitosane est relativement lisse, homogène, sans pores ni fissures et avec une bonne intégrité structurale. L'association de chitosane dans le PVA a modifié la morphologie de surface du motif du film de PVA, lui conférant une surface poreuse et rugueuse. La rugosité probablement était due au fait que les molécules de Ch perturbaient la structure compacte de la matrice de PVA. Le PVA et le chitosane pourraient exercer une interaction par enchevêtrement en formant des liaisons hydrogène intermoléculaires.

Après la co-réticulation du PVA-Ch (**Fig. 6.22d**), les morphologies de surface des films de PVA-Ch sont devenues relativement lisses et plates, montrant ainsi la compatibilité élevée des deux polymères avec comme modèle le médicament [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] et une phase compacte dépourvue de séparation. Aucune bulle d'air, pores, fissures ou gouttelettes n'a été observée (**Fig. 6.22d, e, f**) à l'exception des points rare blancs (probablement du médicament). Ceci confirme la haute compatibilité des deux polymères, similaire à celle observée par Parida *et al.*, 2012 (Umesh *et al.*, 2011). Une comparaison des micrographies révèle que le changement de morphologie de la surface

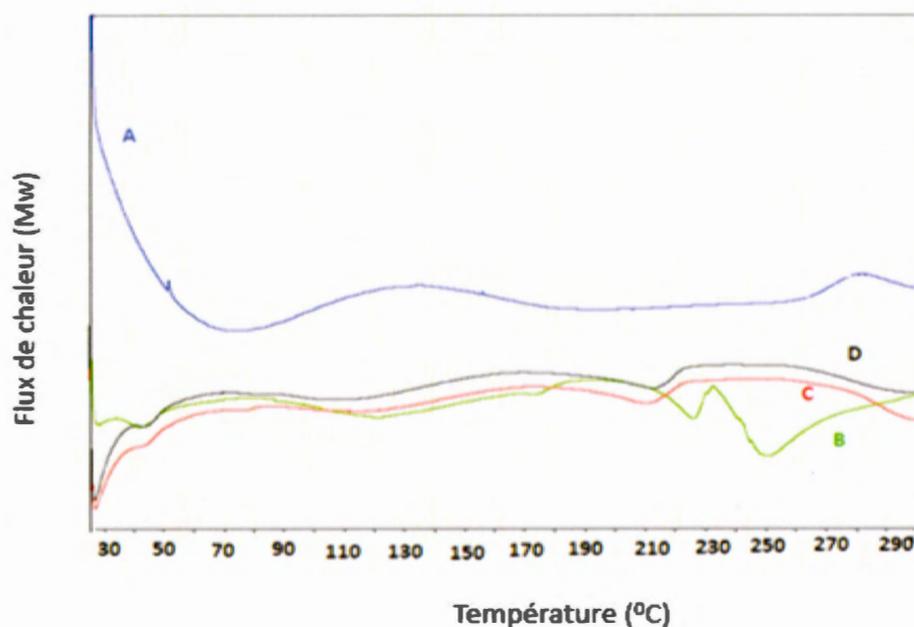
du film de PVA-Ch pourrait être attribué à l'introduction de génipine. Les micrographies des méthodes M2 et M3 (**Fig. 6.22e, f**) présentent des surfaces plates et compactes très dispersées sans aucune séparation de phase;  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  peut être bien dispersé dans une matrice réticulée de PVA-Ch et former un film aussi homogène et dense sans séparation de phase ni agglomération évidente.



**Figure 6.23 Microscopie des films.** Micrographies MEB des films (a)PVA (b)Chitosane (c)PVA-Ch (3-1) non réticulé (d)PVA-Ch/M1 (3-1) (e)PVA-Ch/M2 (3-1) (f) films composites de PVA-Ch/M3 (3-1). Les solutions filmogènes pour les films (d), (e) et (f) contenaient du  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  250  $\mu\text{M}$ .

### 6.3.2 Analyse DSC

Les échantillons de films ont été caractérisés par DSC pour déterminer la stabilité thermique. La **figure 6.23** montre les courbes DSC du film de PVA/Ch obtenus avec diverses méthodes : (A) Ch, (B) PVA, (C) PVA-Ch, (D) PVA-Ch/[Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]. Un large pic endothermique autour de 75 °C est observé pour l'échantillon de chitosane (A), tandis que le film PVA (B) présente un pic endothermique plus petit autour de 120 °C. L'analyse thermique des films composés (courbes C, D) a montré que la température de fusion (T<sub>m</sub>) se modifiait en raison de l'interaction des deux polymères.



**Figure 6.24** Courbes de calorimétrie différentielle des films natifs et composites. (A) chitosane, (B) PVA, (C) PVA-Ch(3-1) et (D) PVA-Ch(3-1)/[Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>].

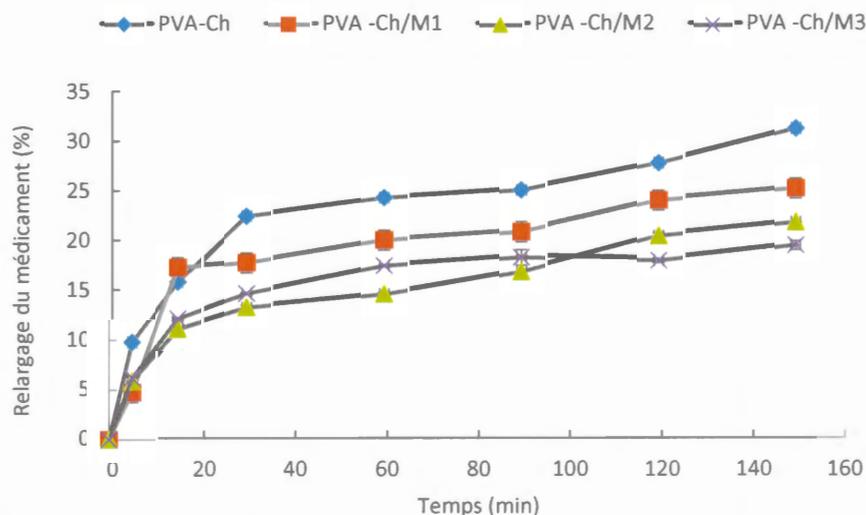
Plus tôt, Chung *et al.* (1999) ont rapporté que, dans le cas du PVA et du chitosane, le pic de fusion du PVA diminuait avec l'augmentation de la quantité de chitosane en raison de l'interaction moléculaire (Chuang *et al.*, 1999). Par conséquent, les chaînes

de chitosane et les chaînes de PVA peuvent exercer une interaction moléculaire et cette interaction détruit en partie la cristallinité des segments de PVA, de même que la réticulation qui a un effet important sur les cristallites. Les courbes DSC du film PVA-Ch (C) présentent le point de fusion à 217 °C et le PVA-Ch/[Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (D) à environ 219 °C, étant tous les deux plus bas que le film PVA (250 °C). La décomposition du PVA paraît à (250 °C). En raison de l'interaction des chaînes moléculaires de PVA et la chitosane et la réticulation, les films ont perdu la cristallinité et présentent des propriétés amorphes. L'inclusion de [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] comme agent thérapeutique modèle n'a pas eu d'effets significatifs sur la stabilité thermique des films.

### 6.3.3 Libération *in vitro* du médicament

Le profil de libération de médicament à partir des films synthétisés par divers rapports de réticulation est présenté à la **Figure 6.25**. L'étude de libération de médicament a été réalisée en solution tampon PBS (pH 7.2) afin d'identifier l'effet de la réticulation sur la libération de [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]. En augmentant la réticulation, une diminution de la libération de médicament était observée pour tous les composites réticulé.

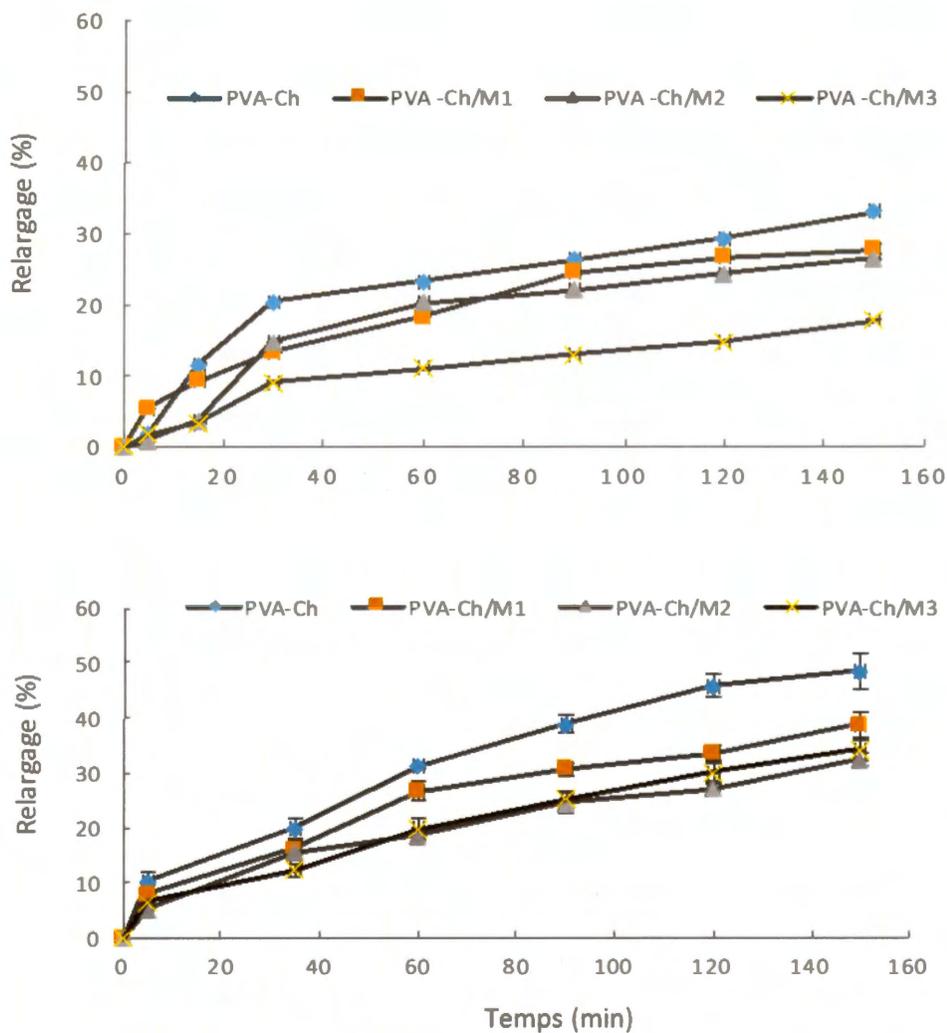
Les films composites de PVA-Ch non-réticulé ont montré des taux de libération de médicament plus grand, d'environ 33 % sur 160 min par rapport aux composites réticulé (**Fig. 6.25**). Ainsi, la libération du médicament dépend de la nature de la matrice polymère ainsi que du pH du milieu. Le taux de libération de [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] dans le milieu de dissolution pourrait être limité à cause de la réticulation et en créant un réseau unique. La vitesse de libération était plus lente pour le film composite PVA-Ch/M1, 25 % en masse de [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] étaient libérés par le composite à pH 7.2 en 160 minutes, au fur et à mesure que la réticulation augmentait, la libération du médicament ralentissait.



**Figure 6.25 Relargage de médicament par les films composites à 37 °C, pH 7.2, pour 10 % en masse de  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  chargé dans des films composites PVA-Ch (3-1); PVA-Ch non-réticulé et PVA-Ch réticulé par 0.05 % Gp; PVA-Ch/M1, PVA-Ch/M2, PVA-Ch/M3.**

Les données de libération (**Fig. 6.25**) montrent que les formulations avec co-réticulation (PVA-Ch/M2, PVA-Ch/M3) présentaient des taux de libération de médicament plus faibles (22 % et 20 %) que les formulations (PVA-Ch/M1) avec une seul-réticulation. Le taux de libération devient assez lente lorsque la matrice est réticulée, en raison de l'enchevêtrement du réseau de composite. L'augmentation de la concentration de l'agent de réticulation provoque la création d'un réseau plus rigide, de porosité plus dense et une diminution du taux de libération de médicament.

La **Figure 6.26** montre le taux de libération d'acétaminophène des films de matrice aux pH 1.2 et 7.2. La vitesse de libération était plus rapide pour tous les échantillons lorsque le pH était bas comparé au pH neutre. À pH acide, la libération de médicament sur 180 minutes est d'environ 53 % pour le PVA-Ch non-réticulé, est diminuée à 42 % pour le PVA-Ch/M1 à 34 % pour le PVA-Ch/M2 et à 36 % pour le PVA-Ch/M3.



**Figure 6.26 Relargage d'acétaminophène par les différents films à 37 °C, pH 2.1 et pH 7.2.** Libération de médicament (%) vs. temps pour 10 % en masse d'acétaminophène chargé dans des films composites de PVA-Ch (3-1), PVA-Ch, PVA-Ch/M1, PVA-Ch/M2, PVA-Ch/M3 (a) pH 7.2 (b) pH 2.1.

Cependant, une différence considérable de libération de médicament a été observée dans les deux solutions tampons. La quantité de médicament libérée diminuait avec l'augmentation de degré de réticulation dans l'hydrogel. Cela est peut-être due au fait que le groupe amino dans le chitosane a des valeurs de pKa de  $\sim 6.5$ , ce qui conduit à une protonation dans une solution acide à neutre avec une densité de charge dépendante du pH. Cependant, selon les objectifs du projet, le pH acide n'est pas relévant à l'application transdermale.

## CHAPITRE VII

### DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS

Le cuivre(II) joue un rôle essentiel dans tous les organismes vivants. Tandis que des quantités infimes de cuivre sont nécessaires aux processus métaboliques normaux, il peut être extrêmement toxique en excès. Les ions de cuivre sont transportés dans des systèmes biologiques: *ex* par des protéines telles que la céruloplasmine (portant environ 90 %). De plus, de petites molécules biologiquement actives, telles que des complexes avec des acides aminés capables de se lier et de transporter le cuivre ont diverses fonctions physiologiques et peuvent posséder des propriétés thérapeutiques.

Le complexe histidine cuivre(II) dans le sang joue un rôle clé dans le transport du cuivre et dans sa disponibilité pour les cellules et les tissus (Gala *et al.*, 2014). La dérégulation du métabolisme du cuivre entraîne diverses maladies. Les propriétés de transport du complexe histidine de cuivre(II) ont abouti à son application dans le traitement de la maladie de Menkes, considérée comme mortelle au cours de la première décennie de vie. La céruloplasmine, protéine de cuivre bleu circulatoire, possède des propriétés antioxydantes, cardioprotectrices et neuromodulatrices (Mateescu *et al.* 1995). En dépit de son potentiel thérapeutique, la céruloplasmine ne peut pas être utilisée comme médicament en raison de sa nature protéique avec des risques immunogènes et dangers liés à son d'origine animale. On a ainsi émis l'hypothèse que les petits complexes de cuivre pourraient présenter un intérêt à certains égards, étant comparables aux protéines de cuivre, mais avec une administration plus facile et une meilleure acceptabilité par les affaires réglementaires.

Dans le présent projet, il a été considéré d'inclure l'étude des propriétés antioxydantes et de la biocompatibilité de l'histidine, la serine, l'urée, le biuret et leurs complexes de cuivre(II).

Le Cu(II) peut être coordonné avec divers ligands en tant que complexes monodentés, bidentés et tridentés. Dans ce projet de thèse, nous avons synthétisé des complexes de cuivre avec divers ligands donnant différents types de coordination et il a été constaté que le type de coordination pouvait avoir un effet sur la capacité antioxydante. Par exemple,  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  (tridenté) a une capacité antioxydante supérieure à celle de  $[\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2]$  (monodenté).

Au meilleur de nos connaissances, cette étude est l'une des premières montrant la capacité antioxydante des complexes de cuivre. L'utilisation de complexes de cuivre comme antioxydants peut constituer un moyen intéressant de protéger des cellules en culture (telles que les neurones) ou des tissus destinés à l'implantation ou au traitement de maladies aiguës ou chroniques.

De plus, il a été rapporté que l'administration sous-cutanée de cuivre(II)-histidine est probablement efficace dans le traitement de la cardioencéphalomyopathie hypertrophique infantile (Freisinger *et al.*, 2004), une maladie mortelle liée au déficit en enzyme de cuivre cytochrome c oxydase. Cependant, l'administration quotidienne injectable de ce complexe complique l'utilisation et d'autres voies d'administration sont souhaitables. Par exemple, en cas de cardioencéphalomyopathie, l'absorption intestinale impliquant ATP7A n'est pas affectée, par conséquent une absorption orale ou transdermique du cuivre peut être bénéfique. Contrairement aux procédures précédentes générant un produit injectable liquide, nous avons synthétisé les complexes de cuivre dans l'isopropanol et obtenu les produits sous forme de poudre compatible avec d'autres formulations comme administration alternative. Par conséquent, l'isolement de l'histidine cuivre(II) à l'état solide peut être utile pour l'administration transdermique dans diverses maladies liées au cuivre.

### 7.1 Caractérisation structurale des complexes à cuivre(II)

Un complexe à cinq coordinations  $[\text{Cu}(\text{His})_2]$  a été décrit par Deschamps *et al.* (Deschamps *et al.*, 2005). L'étude a montré une géométrie pyramidale carrée déformée avec des ligands bidentés et tridentés de L-histidine (**Fig. 6.1B**). L'étude cristallographique du  $[\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2]$  (**Fig. 6.2A**) révèle que les ions Cu(II) sont hexacoordinés par quatre ponts chlore et par les atomes d'oxygène de deux molécules d'urée, montrant une stéréochimie octaédrique allongée. La structure proposée pour Cu(II)Biuret<sub>2</sub> (**Fig. 6.2B**) est basée sur la corrélation des résultats obtenus par diffraction de rayons X avec notre préparation et ceux décrits par Freeman *et al.* (1966) qui ont signalé que l'atome de cuivre avait un numéro de coordination 6 et que les molécules de biuret, comme des chélates bidentés via leurs atomes d'oxygène, pourraient agir dans un environnement octaédrique déformé de manière tétragonale (Freeman *et al.*, 1959).

La cristallisation de  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  n'a pas abouti dans l'isopropanol. Par conséquent, une structure possible pour ce complexe (**Fig. 6.2B**) a été attribuée sur la base de la diffraction des rayons X des cristaux décrite précédemment par Freeman *et al.* (Gangopadhyay *et al.*, 2016) et est conforme à notre résultat de analyse élémentaire (**Tableau 6.1**). Sa liaison aux quatre atomes d'oxygène des ligands est covalente, comme l'indiquent les longueurs de liaison Cu-O, tandis que les distances Cu-Cl ont révélé une liaison ionique entre les ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Cu}^{2+}$ , similaires à celles trouvées pour les complexes cuivre-urée (Gangopadhyay *et al.*, 2016).

### 7.2 La stabilité des complexes à cuivre(II) dans des milieux physiologiques

Compte tenu de l'utilisation potentielle de ces complexes de cuivre, il était intéressant d'explorer leur stabilité dans divers milieux physiologiques. Les spectres de  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  dans  $\text{H}_2\text{O}$ , dans une solution saline physiologique et dans SIF ont montré une absorption maximale à 620-640 nm (**Fig 5.4 A**). Dans le SGF (pH 1.2), l'absorption était maximale à 750 nm, probablement à cause du cuivre non lié au vu de Deschamps

*et al.* suggérant qu'à  $\text{pH} \leq 3.7$ , la majeure partie du ligand restante étant non liée. Lorsque l'histidine est sous forme neutre (SIF), les interactions cation- $\pi$  sont attractives mais lorsqu'elle est protonée ( $\text{His}^+$ ) en SGF, l'interaction devient repoussante.

En SGF un comportement semblable a été observé pour  $\text{Cu}(\text{Ser})_2$  (**Fig. 6.4.B**). L'absorption maximale était de 750 nm, ce qui pourrait être attribué à la protonation des groupes de coordination et finalement au cuivre non lié. Il est à signaler que les spectres du  $\text{Cu}(\text{II})\text{Urée}_2\text{Cl}_2$  et du  $\text{Cu}(\text{II})\text{Biuret}_2\text{Cl}_2$  dans  $\text{H}_2\text{O}$ , dans 0.9 % NaCl et dans du SGF ( $\text{pH} 1.2$ ) ne présentaient pas de grands changements (**Fig. 6.4C, D**). Cependant, une remarquable diminution du signal ( $\approx 50\%$ ) a été observée dans les spectres des complexes à cuivre(II) [ $\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2$ ], dans du SIF ( $\text{pH} 7.4$ ). Dans ce cas, il est possible que les ions phosphates présents dans le SIF déplacent les deux ligands du pont chlore semi-coordinés des positions apicales en formant un précipité avec le cuivre(II) (Naumov *et al.*, 2001). D'autre part, la ressemblance entre les spectres  $\text{Cu}(\text{II})\text{Urée}_2$  et du  $\text{Cu}(\text{II})\text{Biuret}_2$  avec le spectre du  $\text{CuCl}_2$  indique une possible instabilité de ces complexes dans les milieux aqueux. D'après Deschamps *et al.* (Deschamps *et al.*, 2005), la ligature tridentate confère une plus grande stabilité par rapport aux ligatures bidentée et monodentée. Bien que le mode de coordination de Ser autour du centre du cuivre(II) soit bidenté, la stabilité relative du complexe sérine par rapport à celle des complexes urée et biuret pourrait résulter de l'architecture en anneau chélaté à cinq chaînons thermodynamiquement stable.

Des mesures de voltamétrie cyclique avec chaque complexe ont été effectuées dans du sérum physiologique. Pour  $\text{CuCl}_2$ , [ $\text{Cu}(\text{Biuret}_2)\text{Cl}_2$ ] et [ $\text{Cu}(\text{Urea}_2)\text{Cl}_2$ ], les débuts de la réduction sont similaires par rapport aux complexes de cuivre d'urée et de biuret. Le début de la réduction du blanc (solution saline tampon), du  $\text{CuCl}_2$ , de [ $\text{Cu}(\text{Ser}_2)$ ] et [ $\text{Cu}(\text{His}_2)\text{Cl}_2$ ] est décalé cathodiquement et affiche des valeurs de courant de crête faiblement définies (**Fig. 6.5**). Sur la base des résultats des mesures voltamétriques,

[Cu(Ser)<sub>2</sub>] et [Cu(His)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub>] ont des stabilités plus élevées par rapport à CuCl<sub>2</sub>, [Cu(Biuret)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub>] et [Cu(Urée)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub>] (Daniele et Pena, 1993).

### 7.3 Capacité antioxydante *in vitro*

Les activités antioxydantes des complexes de cuivre et de leurs ligands ont été évaluées à l'aide d'analyses d'antioxydants, où le réactif DPPH est utilisé avec le mécanisme HAT, tandis que le réactif DPD est utilisé avec le mécanisme SET. D'ailleurs, le test DPD a été déjà utilisé pour déterminer de l'activité antioxydante de l'urée par Wang *et al* (1999). Le potentiel antioxydant de l'histidine, serine, urée, du biuret et des leurs complexes a été mis en évidence avec le test DPPH•. Ce test est recommandé pour les composés contenant des groupes -SH, -NH et -OH (Popovici *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2016). Les résultats présentés dans la **Figure 6.8** montrent que les complexes [Cu(His)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub>] et [Cu(Biuret)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub>] présentaient une activité de piégeage plus élevée que celle de leur ligand seul et des autres complexes du cuivre. Les complexes sérine et urée-cuivre présentaient des capacités de piégeage des ROS proches de celles de leur ligand libre (**Fig. 6.7**).

L'hypothèse qui pourrait expliquer ce comportement est basée sur la cinétique de la réaction entre le DPPH• avec les antioxydants. Dans ce cas, il est possible que l'urée et le [Cu(urée)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub>] aient la capacité de réduire le radical DPPH• par don d'hydrogène (du groupe NH) en accomplissant l'étape rapide (Zou *et al*, 2016) mais que le temps d'incubation utilisé (30 min) dans l'analyse ne fût pas adéquat à la cinétique de réaction entre l'urée et le [Cu(urée)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub>] avec les produits d'oxydation / dégradation de l'étape lente (Mishra *et al.*, 2012).

Le potentiel antioxydant de l'histidine, serine, urée, du biuret et des complexes cuivriques a été aussi évalué par le test DPD. La génération de ROS est déterminée par le pourcentage d'oxydation de DPD. En présence de complexes ou de ligands de cuivre, une partie des ROS peut être piégée, laissant moins de ces espèces disponibles pour oxyder la DPD. Une activité antioxydante supérieure du biuret et du [Cu(Biuret)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub>]

par rapport à celle d'urée et du  $[\text{Cu}(\text{urée})_2\text{Cl}_2]$  pourrait être due à la présence de plus de groupes amide dans le ligand biuret qui ne sont pas impliqués dans la coordination du complexe ou à une meilleure structure favorable au processus de piégeage. L'urée et le biuret seuls semblent également présenter une capacité considérable de piégeage des radicaux.

#### 7.4 Biocompatibilité de l'histidine, serine, urée, biuret et de leurs complexes de cuivre(II)

L'histidine et l'urée présentaient une bonne biocompatibilité en fonction de la concentration. La Ser et le biuret ont entraîné une perte de viabilité modérée liée à la concentration (~70 % viabilité). La cytotoxicité de la sérine pourrait être due à la racémisation par une sérine racémase neuronale de la L-sérine en D-sérine connue pour être impliquée dans la neurodégénérescence (Wolosker *et al.*, 2008). La cytotoxicité du biuret pourrait être due à la transformation du biuret en produits autres que l'urée ou à une éventuelle action chaotrope plus forte que celle de l'urée.

Cependant, l'action métabolique du biuret dans les cellules neuronales est encore inconnue. La concentration physiologique normale de cuivre dans le parenchyme cérébral est de 70  $\mu\text{M}$  et des concentrations allant jusqu'à 1300  $\mu\text{M}$  ont été observées dans le cerveau de patients atteints de la maladie de Wilson (Scheiber *et al.*, 2014). La toxicité du  $\text{CuCl}_2$  en culture cellulaire est bien connue et peut être attribuée à sa capacité à générer des ROS. Il est à noter que les complexes de cuivre étaient moins toxiques pour les neurones que les concentrations équivalentes de  $\text{CuCl}_2$  (Fig. 6.9).

Les complexes  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Cu Ser}]_2$  et  $[\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2]$  ont montré une biocompatibilité similaire avec les neurones P19 (70 % de viabilité cellulaire à 200  $\mu\text{M}$ ) tandis que la toxicité de  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  était proche de celle de  $\text{CuCl}_2$  (~50 %).

Bien que le biuret, le  $[\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2]$  et le  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  présentent une remarquable activité antioxydante mesurée par les méthodes *in vitro* DPPH et DEPDA, ils ont

affecté la viabilité neuronale. Les résultats suggèrent que, dans les systèmes biologiques, des phénomènes supplémentaires pourraient se produire. Il n'est pas exclu que les complexes bidentés  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  et  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  ainsi que les monodentés  $[\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2]$  puissent libérer des ions cuivre dans le milieu de culture, ce qui entraînerait une modification du pH environnant, augmentant la génération des ROS et la promotion de l'apoptose qui va endommager l'ADN (Jazvinscak Jembrek *et al.*, 2014). En revanche, le complexe tridentate  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  présentait une bonne activité antioxydante et, en outre, une viabilité cellulaire modérée allant jusqu'à 200  $\mu\text{M}$ . La cytotoxicité des complexes de cuivre(II) était inférieure à celle de concentrations équivalentes de  $\text{CuCl}_2$ . Bien que  $[\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2]$  semble moins stable que  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ , la perte de viabilité est similaire dans les deux cas. N'est pas exclu que l'urée, qui constitue une excellente capacité antioxydante (Wang *et al.*, 1999), puisse protéger les cellules contre les dommages oxydatifs éventuels dus à la libération *in situ* du prooxidant cuivre(II). Parmi les composés étudiés,  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  présentait la meilleure biocompatibilité cellulaire et une activité de piégeage des ROS *in vitro* prononcée.

### 7.5 Caractérisation et évaluation des films polymériques réticulés

Les films, PVA, chitosane, PVA-Ch non-réticulé et PVA-Ch réticulé avec divers méthodes (M1,M2,M3) et les films composites contenant  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  ont été analysés avec le microscope électronique à balayage. La rugosité des films composite PVA-Ch non-réticulés probablement était due au fait que les molécules de Ch perturbaient la structure compacte de la matrice de PVA. Le PVA et le chitosane pourraient exercer une interaction par enchevêtrement en formant des liaisons hydrogène intermoléculaires. Le film PVA-Ch (3-1) non réticulé présentait une surface rugueuse avec pores et trous sur la structure. Après réticulation, le film de PVA-Ch était très lisse et homogène, sans porosité ni fissure, globalement avec une bonne intégrité structurale. Les morphologies de surface des films de PVA-Ch avec  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  immobilisé sont devenues relativement lisses et plates, montrant ainsi la

compatibilité élevée des deux polymères avec le modèle de médicament  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  et une structure compacte sans séparation de phase. Ceci confirme la haute compatibilité des deux polymères, similaire à celle observée par Parida *et al.* (Parida *et al.*, 2012).

Les échantillons de films ont été caractérisés par DSC pour déterminer la stabilité thermique (Fig.6.14). Un large pic endothermique à environ 75 °C a été observé pour l'échantillon de film chitosane (courbe a), tandis que le film PVA (courbe b) présentait deux pics endothermiques. Le premier pic à 88.1 °C a été attribué à un effet thermique dû à l'évaporation de l'humidité de l'échantillon et peut également être dû à une transition vitreuse et un pic endothermique de fusion autour de 228 °C. Cependant, la valeur obtenue pour la température de fusion (228.6 °C) est cohérente avec celle trouvée par Yang *et al.* À 228.3°C. (Yang *et al.*, 2008). L'analyse thermique des composés (c, d) par DSC a montré que la température de fusion ( $T_m$ ) se modifiait en raison de l'interaction des deux polymères. La température de fusion de film PVA-Ch (c) est décalée à une température inférieure en présence de chitosane dans le film. Plus tôt, Chung *et al.* (1999) ont rapporté que, dans le cas du PVA et du chitosane, le pic de fusion du PVA diminuait avec l'augmentation de la quantité de chitine en raison de l'interaction moléculaire. Par conséquent, les chaînes de chitosane et les chaînes de PVA peuvent exercer une interaction moléculaire et cette interaction détruit en partie la cristallinité des segments de PVA, de même que la réticulation a un effet important sur les cristallites. En outre, il n'y a pas de différence de point de fusion entre le film PVA-Ch réticulé et PVA-Ch réticulé contenant  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ . On peut donc en déduire que le contenu en médicament n'a pas d'effet significatif sur la stabilité thermique des films.

La stabilité thermique étudiée par TGA (25 °C à 900 °C) (Fig. 6.13) a montré plusieurs étapes de perte de masse des films en raison de l'évaporation de l'eau et de la dégradation liée à la décomposition du matériau (Guirguis et Moselhey, 2012). L'eau

est considérée comme l'un des principaux produits de décomposition à des températures inférieures à 270 °C. Un chauffage supplémentaire jusqu'à 600 °C a entraîné la décomposition, la fusion et finalement une carbonisation et la formation de cendre. Un comportement similaire des films de chitosane a été rapporté dans la littérature (Diab *et al.*, 2012). Entre 327 °C et 395 °C, la décomposition supplémentaire du film pourrait être attribuée à un processus complexe impliquant la déshydratation des cycles saccharidiques et la dépolymérisation des unités acétylées et désacétylées du polymère.

Les études de DSC montraient la températures de fusion des film PVA et Ch en comparaison avec ceux des films PVA/Ch étaient significativement différentes. Cela semble être due à la diminution de l'association ordonnée des chaînes de polymères du PVA résultant de la liaison hydrogène entre les groupes –OH du PVA et des groupes –OH et –NH<sub>2</sub> du chitosane qui se produit à l'état amorphe. Les pics endothermiques pour du film PVA/Ch non-réticulé et du film réticulé (PVA/Ch/M1) étaient très semblables et avec une température plus basse pour le composite réticulé. Thermodynamiquement, la réduction du point de fusion est due de à l'interaction entre les polymères et de la modification chimique au cours de la réticulation chimique, ce qui pourrait entraîner une réduction de la densité de la liaison hydrogène du réseau PVA (Sashina *et al.*, 2006). La **Figure 6.14** (a, b) montre qu'il y a un léger décalage dans la transition de fusion endothermique à une température plus élevée avec une augmentation de la génipine en tant qu'agent de réticulation double (**Fig. 6.14b, c**). L'analyse par thermogravimétrie a clairement montré la stabilité thermiques des film PVA-Ch composites augmente avec la présence de réticulant. Cette stabilité améliore sa manipulation pour les applications commerciales de production biomatériaux à l'aide de techniques de traitement à l'état fondu.

Des études aux rayons X ont été effectuées pour examiner les modifications de la structure cristalline et amorphe des films composites. La diffraction des rayons X du

film a base de PVA présente (**Fig. 6.21**) un pic cristallins net, avec un fort maximum à  $(2\theta) = 20^\circ$  ; cela correspond à la nature semi-cristalline du film de PVA. Les résultats étaient en accord étroit avec Mansur., *et al* (2008). Les diagrammes de diffraction des rayons X montrent que l'intensité du pic de film PVA a diminué et est devenue faible pour les films composites de PVA-Ch/M3 (**Fig. 6.21**). Ceci est attribué aux zones cristallines dispersées dans la zone amorphe de chitosane. Ces résultats montrent aussi que la cristallinité du film PVA-Ch est nettement inférieure à celle du film PVA. En outre, les résultats du diffractogramme de film PVA-Ch/M3 indiquent également que le pic cristallin aigu était significativement diminué et élargi avec co-réticulation in matrice, en comparaison avec le composite réticulé (PVA-Ch/M1) . Peut-être que cela n'affecte pas l'uniformité de la structure de la matrice polymère mais améliore plutôt l'ordre moléculaire dans la phase amorphe de la matrice polymère (Cho *et al*, 1999). Les résultats montrent que les films ont perdu la cristallinité après réticulation et combinaison au chitosane peut-être dû à des liaisons hydrogènes intermoléculaires entre PVA et le chitosane qui pourrait être annulées, abaissant la cristallinité.

L'absorption de fluide a été évaluée avec des films de PVA, chitosan et les films composites de PVA-Ch non- réticulée et réticulée avec du STMP et de la génipine. Le comportement d'absorption de fluide par le polymère dépend de la nature du milieu et des polymères telles que les groupes hydrophiles, la densité réticulations, le pH et la température du milieu de gonflement. Par conséquent, tout changement dans le réseau de structure de film pourrait affecter directement son comportement de gonflement. La **Figure 6.17a** montre que pour les films PVA et PVA-Ch composite (3-1), (1-1) et (1-3) à pH 7.2 et 37 °C, le comportement de gonflement est notamment influencé par la teneur en chitosane du composite. L'augmentation de la teneur en chitosane dans la matrice a considérablement augmenté la capacité de gonflement, en raison de la présence de groupes plus hydrophiles dans les réseaux. les films PVA et PVA-Ch composite à pH 2.1 ont montré une capacité de gonflement plus élevé que le pH 7.2. Cela est probablement due à la protonation des groupes fonctionnels amine dans le

réseau, induisant une répulsion électrostatique supplémentaire entre ces groupes et conduisant à un gonflement du gel. Les résultats pour le film PVA-Ch (3-1) après réticulation ont révélé une influence significative de la réticulation sur le taux d'absorption de fluide. Le taux d'absorption de fluide a considérablement diminué par réticulation. Ce phénomène pourrait être dû à un réseau plus rigide formé par des réactions intermoléculaires entre les deux chaînes de polymères. En outre, la genipine rend le réseau composite plus dense, empêchant ainsi le passage de l'eau dans les films. Après réticulation et formation de liaisons covalentes entre les chaînes, la flexibilité du film a été réduite. Ces résultats correspondent donc au structure d'hydrogel attendu, dans lequel les groupes hydrophiles dans le réseau de polymères favoriseront l'absorption d'eau. La réticulation limite la diffusion de l'eau et diminue le taux de gonflement.

La biocompatibilité des films a été étudiée par le test MTT. Afin d'évaluer la biocompatibilité des films en présence de médicament ( le complexe  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  a été immobilisé dans les film composites PVA-Ch (3-1) avec différentes méthodes de réticulation (M1,M2,M3) (**Fig. 6.18**). Les données ont montré qu'approximativement 70 à 90 % des cellules adhéraient au film composite réticulé PVA-Ch (par rapport au témoin) mais seulement environ 40 % des cellules adhéraient au PVA-Ch non- réticulé (par rapport au témoin). La faible viabilité cellulaire est attribuée à la solubilité des polymères (non réticulés) dans la meillieux de cellules et aussi au pH et aux sels dans les films, car ils n'ont pas été neutralisés dans la processus de préparation des films de PVA-Ch non réticulé. L'adhésion cellulaire du film est l'autre critère important d'amélioration de la prolifération cellulaire. Les densités de charge cationique du chitosane et de la GP ont tendance à attirer la membrane cellulaire chargée négativement, ce qui montre favorablement que le PVA-Ch/GP est pas toxique pour les cellules P19. Les résultats de viabilité cellulaire sur des films PVA-Ch avec inclusion de cuivre(II)-histidine (**Fig. 6.18**), ont révélé que la biocompatibilité des films composites réticulés à différentes concentrations de GP était supérieure à 70 %. Ainsi,

selon l'évaluation biologique des dispositifs médicaux d'après la norme ISO 10993-5 (Li *et al.*, 2015), les membranes étaient considérées comme non-toxiques.

Ces résultats ont montré que la génipine, en tant qu'agent de réticulation naturel, avait une toxicité inférieure à celle du glutaraldéhyde. De nombreux facteurs permettent de contrôler les interactions cellulaires avec le biomatériau réactif, le gonflement, le pH, la température et la réticulation (Mathews *et al.*, 2008). Les résultats avec des cellulesensemencées sur des membranes de PVA-Ch suggèrent que ces membranes sont non toxiques et biocompatibles, en accord avec des études apparentées.

Le profil de libération de médicament à partir des films synthétisés a été réalisé avec des solutions tampons de PBS (pH 7.2) et tampon acide (pH 2.1) pour identifier l'effet de la réticulation sur la libération de  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  et d'acétaminophène (Fig. 6.25, 6.26). À cause de la faible stabilité de  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  dans les milieux acide, il était seulement évalué dans le pH neutre. Les données ont montré qu'en augmentant le degré de réticulation, une diminution considérable de la libération de médicament a été observée pour tous les films de composites. Les films composites PVA-Ch (3-1) non réticulés ont montré des taux de libération de médicament plus grands, d'environ 33 % sur 160 min par rapport aux PVA-Ch/M1, PVA-Ch/M2 et PVA-C/M3 qui libèrent environ 20 à 25 % respectivement. Le taux de libération devenait assez lent dans, en raison de la création du réseau en composite à partir de la réticulation. L'augmentation du degré de réticulation provoque la création d'un réseau plus rigide de porosité plus fine et une diminution du taux de libération de médicament. L'agent de réticulation a influencé la porosité de la structure composite. Ces résultats indiquent que le film de PVA-Ch réticulé est utile dans les systèmes d'administration de médicaments. Cependant, selon Juliano *et al.*, 2008, la chlorhexidine incorporée dans des films à base d'alginate et d'alginate / chitosane a montré que seulement 30 à 35 % du médicament était libéré en 90 minutes (Juliano *et al.*, 2008). Lors du contact avec des fluides biologiques, le film polymère commence à gonfler après la relaxation des

chaînes polymère, entraînant la diffusion de l'agent bioactif. La libération du médicament est en relation directe avec la structure du polymère; par exemple, les polymères amorphes linéaires se dissolvent beaucoup plus rapidement que les polymères réticulés ou partiellement cristallins (Karki *et al.*, 2016).

À pH acide (**Fig.6.26**), la libération de médicament pendant 160 min est d'environ 53 % pour le PVA-Ch non-réticulé, ce qui diminue à 36 % pour le PVA-Ch/M3. Cela est peut-être dû au fait que le groupe amine dans le chitosane a des valeurs de pKa de ~ 6.5, ce qui conduit à une protonation dans une solution acide à neutre avec une densité de charge dépendante du pH. Ces résultats sont conformes avec ceux de Mulchandani, (2017), selon lesquels un composite de PVA et de chitosane réticulé avec du glutaraldéhyde réagit au pH et augmente le taux de libération de médicament lorsque le pH est plus faible. Mi *et al* (2002). rapportent que le taux de libération d'indométacine du chitosane-alginate réticulé avec la génipine augmente avec la diminution du pH en raison de la diminution de la densité de réticulation des billes (Mi *et al.*, 2002).

## 7.6 Conclusions

Quatre complexes de cuivre:  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2]$  et  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  ont été synthétisés dans de l'isopropanol et ont présenté des structures tridentée (His), un bidentée (Ser et biuret) ou monodentée (urée) en coordination avec le cuivre(II). L'un des objectifs du projet de thèse était d'évaluer le potentiel antioxydant des complexes de cuivre, l'accent étant mis en particulier sur l'action biochimique des complexes de cuivre et leurs applications dans les techniques biomédicales (cellules et tissus en culture). Tous les complexes de cuivre présentait un piégeage efficace des radicaux lors d'essais avec des tests DPD et DPPH. Il a été constaté que le type de coordination peut avoir un effet sur la capacité antioxydante.

À notre connaissance, cet article est l'une des premières études montrant la capacité antioxydante des complexes de cuivre. L'utilisation des complexes de cuivre antioxydants peut constituer un moyen intéressant de protéger des cellules en culture (telles que les neurones) ou des tissus destinés à l'implantation ou transplantation au traitement de maladies aiguës ou chroniques. Les résultats des études de biocompatibilité ont montré qu'ils pouvaient affecter la viabilité neuronale de manière dépendante de la concentration, dans une moindre mesure que  $\text{CuCl}_2$ . Dans notre étude, une bonne biocompatibilité (viabilité cellulaire d'environ 90 %) a été trouvée à des concentrations de complexes cuivriques allant jusqu'à 200  $\mu\text{M}$ . Ces observations ouvrent de nouvelles perspectives pour l'utilisation possible de ces complexes de cuivre(II) en tant qu'agents thérapeutiques pour la cardioencéphalomyopathie, la maladie de Menkes et d'autres troubles neurologiques liés à la carence en cuivre. La spectrophotométrie et la voltamétrie cyclique ont permis d'évaluer la stabilité des complexes dans divers milieux. Les complexes de cuivre des ligands d'acides aminés (His, Ser) présentaient une plus grande stabilité dans différents milieux physiologiques simulés que ceux de l'urée et du biuret, à l'exception du fluide gastrique simulé lorsque tous les complexes étaient instables.

Le  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  était stable, biocompatible et le meilleur en termes de capacité antioxydante, suivi de près par  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ . Les autres complexes de cuivre ont montré une cytotoxicité modérément plus élevée, mais bien inférieure à celle du  $\text{CuCl}_2$  générée par les ions de cuivre(II) libres. Ces observations ouvrent de nouvelles perspectives pour l'utilisation de ces complexes de cuivre ayant un potentiel antioxydant en tant qu'agents thérapeutiques potentiels des maladies neurodégénératives.

Il y a une limitation à l'administration du  $\text{Cu}(\text{His})_2$  pour la maladie de Menkes, car  $\text{Cu}(\text{His})_2$  est obtenu en phase aqueuse. C'est un produit injectable qui n'est pas un composé assez stable sous forme liquide. Par conséquent, le complexe de l'histidine cuivre(II) à

l'état solide peut être utile pour une meilleure formulation orale et pour la formulation transdermique pour traiter diverses maladies liées au cuivre.

Le nouveau composite PVA-Ch a été synthétisé et réticulé chimiquement avec diverses proportions et méthodes différentes. Cependant, l'addition des agents de réticulation chimiques tels que le glutaraldéhyde, ou le formaldéhyde, dans les systèmes d'administration des médicaments peuvent provoquer des réactions cytotoxiques. Par conséquent, nous nous avons abordé l'utilisation du STMP et du composé génipine pour la réticulation du PVA-Ch, ce qui serait plus acceptable comme biomatériau. Des films composites de PVA-Ch avec deux agents de réticulation ont été préparés par coulée en solution « casting ». Les résultats ont montré qu'en modifiant la proportion de chitosane par rapport au PVA, associée à un agent de réticulation différent, les propriétés globales du film composite peuvent être modifiées. L'étude du comportement de gonflement a montré une réduction significative du taux d'absorption de fluide lorsque la teneur en chitosane augmentait et que le degré de réticulation augmentait. Le comportement en désintégration était également influencé par la teneur en chitosane et par la concentration de réticulation. Les films composites à co-réticulation présentaient une dissolution plus lente. En outre, tous les films composites avec différents agents de réticulation évalués, ont présenté une non-toxicité pour les cellules et également une bonne biocompatibilité. En conclusion, ces composites à base de PVA et de chitosane avec réticulation par de STMP et par la génipine offrent une vaste gamme de choix pouvant être potentiellement utilisés pour fournir de nouveaux matériaux avec des propriétés améliorées pour des applications biomédicales.

La vitesse de libération du médicament à partir du composite PVA-Ch dépend de la degré de réticulation (STMP et génipine) et du pH du milieu. Il est conclu que ces membranes de polymères composites peuvent être utilisées en tant qu'outil alternatif avec l'application biomédicale comme candidats à l'administration transdermique de médicaments. Ces résultats *in vitro* laissent entrevoir l'utilisation des complexes à

cuivre étudiés comme agents thérapeutiques administrables par voie transdermique pour des maladies neurodégénératives.

### **Perspective**

Les résultats des études de stabilité sont utiles car ils indiquent les possibilités de réaliser des formulations pharmaceutiques adéquates pour une administration par voie orale et capables de protéger la structure des complexes de cuivre face à l'acidité gastrique.

Des nouveaux films peuvent être fabriqués avec d'autres polymères. Ils peuvent être utilisés pour l'inclusion de divers nanomatériaux ou des médicaments fonctionnels. Par conséquent, les films permettent une incorporation efficace et une libération contrôlée d'agents bioactifs. Également, des agents améliorant la perméation dermique pourraient être étudiés au moyen de tests de solubilité, de tests de perméation de la peau *in vitro* et de tests de stabilité.

## ANNEXES A

### CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES DURANT LE PROJET DE DOCTORAT

A.1 Participation comme première auteure principale d'un article publié dans Journal of Inorganic Biochemistry (2019), vol.192, p. 87-97.

Copper complexes for biomedical applications: structural insights, antioxidant activity and neuron compatibility

Ladan Esmaeili, Mariela Gomez Perez, Maziar Jafari, Joanne Paquin, Pompilia Ispas-Szabo, Veronica Pop, Marius Andruh, Joshua Byers and Mircea Alexandru Mateescu

Contributions: Chercher et étudier la littérature de spécialité, vérifier les méthodes analytiques et effectuer les calculs. Comme auteure principale j'ai effectué les expériences et l'interprétation des résultats. Écrit le manuscrit avec le soutien du Pr. Mateescu comme superviseur de projet. Tous les auteurs ont discuté les résultats et ont contribué au manuscrit final.

Le format PDF de l'article est disponible sur le site des éditions Elsevier à :

<https://authors.elsevier.com/a/1YL2MarcmFp9I>

Le PDF est attachée à cette section A1.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Inorganic Biochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jinorgbio](http://www.elsevier.com/locate/jinorgbio)

## Copper complexes for biomedical applications: Structural insights, antioxidant activity and neuron compatibility

Ladan Esmaili<sup>a,b,1</sup>, Mariela Gomez Perez<sup>a,b,1</sup>, Maziar Jafari<sup>a</sup>, Joanne Paquin<sup>a</sup>,  
Pompilia Ispas-Szabo<sup>a,b</sup>, Veronica Pop<sup>c</sup>, Marius Andruh<sup>c</sup>, Joshua Byers<sup>a</sup>,  
Mircea Alexandru Mateescu<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3P8, Canada

<sup>b</sup> Research Chair in Enteric Dysfunctions "Allergys", Centres Pharmocem and CERMO-PC, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Montréal, Québec H3C 3P8, Canada

<sup>c</sup> University of Bucharest, Faculty of Chemistry, Inorganic Chemistry Laboratory, Str. Dabrova Rosie nr. 23, 020464 Bucharest, Romania

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Histidine  
Serine  
Amino acid copper complexes  
Antioxidants  
Electrolysis induced oxidative stress  
Neuronal derivatives of P19 embryonic carcinoma cells

## ABSTRACT

Copper coordinated with amino acid residues is essential for the function of many proteins. In addition, copper complexed to free L-Histidine, as  $[\text{Cu}(\text{His})_2]$ , is used in the treatment of the neurodegenerative Menkes disease and of cardioencephalomyopathy. This study was aimed to coordinate copper(II) with four small ligands (L-Serine, L-Histidine, Urea and Biuret) and to evaluate structural features, stability, antioxidant activity and neuronal compatibility of the resulting complexes. All complexes were synthesized with  $\text{CuCl}_2$  and purified by precipitation in alcohol. Elemental composition, X-rays diffraction and FTIR indicated that the complexes were in form of  $[\text{Cu}(\text{ligand})_2]$  and exhibited tridentate (L-Histidine), bidentate (L-Serine and Biuret) or monodentate (Urea) coordination with copper. UV–Vis absorbance profiles in physiologically relevant solutions and cyclic voltammetry revealed that, contrarily to  $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$ , the  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  complexes were stable in different media including water, physiological saline and intestinal-like solutions. All complexes and their ligands had antioxidant capacity as evaluated by DPPH (1,1-diphenyl-2,2-picrylhydrazyl) and DPD (*N,N*-diethyl-*p*-phenylenediamine) methods, and the  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  complex was the most potent. Neuronal compatibility was assessed through cell viability measurements using cultured neurons derived from mouse P19 stem cells. Although only  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  showed a good neurocompatibility (about 90% at concentrations up to 200  $\mu\text{M}$ ), the cytotoxicity of the other copper complexes was lower compared to equivalent concentrations of  $\text{CuCl}_2$ . These findings open new perspectives for the use of these copper complexes as antioxidants and possibly as therapeutic agents for neurodegenerative diseases. Furthermore, study of these complexes may help to improve chelation therapy for copper dysfunctions.

## 1. Introduction

Metal ions are involved in a wide range of biological functions in the intra and extracellular contexts of life systems [1]. Among metal cations, copper(II) plays an essential role in all living organisms, for instance as a structural component of several enzymes (ex: laccase, ascorbate oxidase, ceruloplasmin, amine oxidases, superoxide dismutase, cytochrome c oxidase) [2,3]. In contrast to copper bound to proteins or peptides, unbound copper can be highly toxic due to its ability to

generate free radicals via Fenton reaction [4]. Copper ions are transported in biological systems by proteins such as ceruloplasmin (carrying about 90–95% of circulating of copper(II)) and serum albumin in mammals, and hemocyanine in crustaceans. Blue-copper proteins, such as ascorbate oxidase and laccase enzymes, are also frequent in vegetables. Also, small biologically active molecules, such as complexes with amino acids, capable to bind and transport copper have various physiological functions and may possess therapeutic properties [5]. The copper complexes Dicuprene, Alcuprin and copper salicylate can act as

\* Corresponding author at: Département de chimie, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3P8, Canada.

E-mail addresses: [esmaili.ladn@courrier.uqam.ca](mailto:esmaili.ladn@courrier.uqam.ca) (L. Esmaili), [gomez.perez.mariela@courrier.uqam.ca](mailto:gomez.perez.mariela@courrier.uqam.ca) (M.G. Perez), [jafari.maziar@courrier.uqam.ca](mailto:jafari.maziar@courrier.uqam.ca) (M. Jafari), [paquin.joanne@uqam.ca](mailto:paquin.joanne@uqam.ca) (J. Paquin), [ispas-szabo.pompilia@uqam.ca](mailto:ispas-szabo.pompilia@uqam.ca) (P. Ispas-Szabo), [marius.andruh@dnr.ro](mailto:marius.andruh@dnr.ro) (M. Andruh), [byers.joshua@uqam.ca](mailto:byers.joshua@uqam.ca) (J. Byers), [mateescu.mirceaalexandru@uqam.ca](mailto:mateescu.mirceaalexandru@uqam.ca) (M.A. Mateescu).

<sup>1</sup> L.E. and M.G.P. contributed equally to the work.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.12.010>

Received 23 July 2018; Received in revised form 20 December 2018; Accepted 21 December 2018

Available online 26 December 2018

0162-0134/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

anti-inflammatory agents that help to reduce symptoms (pain and stiffness of rheumatoid arthritis) [6]. Cu(II)ATSM: copper(II)-diacetyl-bis(N4-methylthiosemi-carbazone) and kynurenine precursor of anthralinic acid copper ligand exert antioxidant and cardio-protective effects [7,8], and could be beneficial in the treatment of neurodegenerative disorders such as Parkinson's and Alzheimer's diseases [9]. Ceruloplasmin, the circulatory blue copper protein, possesses antioxidant, cardioprotective and neuromodulatory properties [10]. Its active site consists of six copper atoms, and three of them are coordinated by histidine residues [2]. Despite its therapeutic potential, ceruloplasmin cannot be used as a medication due to its protein nature with immunogenic and hazardous risks of animal origin. It was then hypothesized that small copper complexes may be of interest in certain aspects, being comparable to copper proteins, but with an easier administration and a better regulatory acceptability.

Copper amino acid complexes synthesized decades ago have received increasing attention in the past years, particularly for their potential biomedical application [11–13]. One of the important copper chelators is the amino acid L-histidine (His). Copper bound with His represents an exchangeable pool of copper(II) with albumin in blood [5]. His possesses an imidazole group that can coordinate metal ions in metalloproteins and is also part of the catalytic site of various enzymes [14]. Copper(II)-histidine in blood has a key role in copper transportation and availability for cells and tissues [11]. Dysregulation of copper metabolism leads to various diseases. The transport properties of copper(II)-histidine complex ( $[Cu(His)_2]^{2+}$ ) led to its application with success in the treatment of Menkes disease that was considered lethal in the first decade of life [11]. This neurodegenerative disorder consists in a deficient absorption of copper(II) due to an inherited genetic dysfunction of the *ATP7A* gene which codes for a transmembrane protein acting as a copper transporter [15]. There was no cure for Menkes disease until mid-seventies when Sarkar et al. [11] showed that early treatment by intravenous injection of copper(II)-histidine complex can greatly increase life expectancy and delay neurodegeneration [14,16]. Furthermore, it has been reported that sub-cutaneous administration of copper(II)-histidine is probably effective in the treatment of infantile hypertrophic cardioencephalomyopathy [17], a fatal disease related to a deficit of the copper-enzyme cytochrome *c* oxidase. However, injectable daily administration of this complex complicates its use and alternative routes of administration are desirable. For instance, in case of cardioencephalomyopathy, the intestinal *ATP7A*-mediated absorption of copper is not affected; consequently an oral copper administration may be beneficial. Therefore, the isolation of copper(II)-histidine in solid state may be useful for a better oral formulation and for transdermal administration in various copper-related diseases.

L-Serine (Ser) is a non-essential amino acid that can be synthesized by many cells except some cell types, such as neuronal and glial cell subpopulations that rely on the uptake of Ser to support their survival and development [18]. Copper complexed with Ser could be uptaken by cells through Ser transporters in situations of downregulated copper transporters. Urea is an endogenous product of the catabolism of proteins and amino acids, and is present at different concentrations in blood and various organs [19]. Under physiological conditions, urea was shown to act as an antioxidant and as a cardioprotective agent [20]. Biuret is often used together with urea in animal feeding as an excellent non-protein nitrogen additive having a better palatability compared to urea [21]. It contains two acylamino groups and one imino group, a structure compatible with its use as a neutral ligand in various complexes mostly for structural studies or bioanalytical applications (i.e. biuret dosage of proteins). Complexes of rare earth metals [22], actinide metals [23,24], and alkaline earth metals [22,24] based on urea or biuret ligands have been described. However, the complexes of transition metals such as copper with these ligands have been rarely reported [25].

This study describes the preparation and characterization of four low molecular weight copper complexes:  $[Cu(His)_2Cl_2]$ ,  $[Cu(Ser)_2]$ ,  $[Cu$

$(Urea)_2Cl_2]$  and  $[Cu(Biuret)_2Cl_2]$  with special emphasis given to aspects related to the stability of these complexes in physiologically relevant media, to their potential antioxidant activity and to their biocompatibility with neuronal cells in view of their eventual use in the treatment of neurological diseases. Furthermore, study of these complexes may help to improve chelation therapy for copper dysfunctions and to better understand copper metabolism in human.

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Synthesis of copper complexes

All chemicals were reagent grade and were used without further purification. Copper complexes were prepared in isopropanol following Pop et al.'s procedure [25]. The copper(II)-histidine complex was prepared using an 1:2 M ratio of  $CuCl_2$ :His and a 50:1 v/v isopropanol:H<sub>2</sub>O solution. A cold solution (400 mL) of  $CuCl_2$  ( $1.93 \times 10^{-3}$  mol/L) in isopropanol was added dropwise to an equal volume of aqueous His solution ( $3.84 \times 10^{-3}$  mol/L) at pH 6.8, and the mixture was continuously stirred on ice during 45 min. The complexation was done in isopropanol to facilitate the recovery of copper-histidine which precipitates in these conditions. The resulting solid was collected by filtration, washed with cold isopropanol and dried at ambient temperature. The copper-urea and copper-biuret complexes were prepared similarly but using an 1:4 M ratio of  $CuCl_2$ :ligand. The copper-serine complex was prepared in ethanol using an 1:2:1 M ratio of  $CuCl_2$ :L-Ser:NaOH. A cold solution (15 mL) of  $CuCl_2$  ( $2.64 \times 10^{-3}$  mol/L) in ethanol was added dropwise to a solution of 30 mL Ser ( $5.19 \times 10^{-2}$  mol/L) in ethanol containing sodium hydroxide (0.01 mol/L). The mixture was stirred on ice during 30 min, and the resulting solid was filtered, washed with ethanol and dried at room temperature.

### 2.2. Structural characterization

The content of carbon (C), hydrogen (H) and nitrogen (N) was determined by the Dynamic flash combustion method which is based on complete oxidation of samples, using an EAS1108 (Fisons Instruments SpA) and an ECS4010 (Costech Co. California, USA). Melting points were measured using open capillary tubes on a Gallenkamp melting point apparatus (London, England). Analysis by X-ray diffraction was done with a Bruker X8 Venture Metal jet diffractometer (Geesthacht, Germany). The experimental parameters for X-ray analysis are presented in Table 1S (supplementary data). Single crystals were obtained by slow evaporation of alcoholic solution of copper complexes during 3 days. The crystals were kept at 100 K during data collection. The samples were exposed to  $GaK\alpha$  X-rays with a wavelength of 1.34 Å and analyzed at an angular range of 2 $\theta$  from 10 to 121°. The structure was solved using the Olex2 software [26], with the SHELXT structure solution program [27] using Direct Methods and the SHELXL [28] refinement package with the Least Squares minimization method. Data collection and refinement parameters are presented in Section 3.2. The infrared (IR) spectra of the complexes and of their ligands were recorded on a Thermo-Nicolet 6700 (Madison WI USA) FTIR spectrophotometer ( $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ ) by using potassium bromide pellets (2%).

### 2.3. Stability in different media

#### 2.3.1. Spectrophotometric measurements

Solutions of 20 or 40 mM of His, Ser, Urea, Biuret and their copper (II) complexes were prepared in water, in physiological saline (0.9% NaCl), Simulated Gastric Fluid (SGF: 0.26% HCl, 0.2% NaCl, pH 1.2) and In Simulated Intestinal Fluid (SIF: 0.68%  $KH_2PO_4$ , 0.0615% NaOH, pH 7.2). The absorbance spectra (360–960 nm) were taken after 2 h of incubation at room temperature. Time stabilities of the complexes were

investigated by measuring the absorbance values at 37 °C and at constant wavelengths, from 0 to 48 h. Measurements were done using a Visible Ultraspec 100 Pro (USA) Spectrophotometer.

### 2.3.2. Electrochemical measurements

A sealed three necked flask was used for electrochemical measurements. The working electrode was a 3 mm diameter glassy carbon electrode (BASi), the reference electrode was a NaCl saturated Ag/AgCl electrode and the counter electrode was either copper wire or platinum mesh (AlfaAesar). The electrochemical solutions contained copper complexes freshly prepared in physiological saline (0.9% w/v NaCl in deionized water) and were purged by argon for 5 min. All measurements were carried out under argon atmosphere.

### 2.4. Antioxidant capacity

#### 2.4.1. DPD (N,N-diethyl-p-phenylenediamine) colorimetric method

The DPD reagent was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Reactive oxygen species (ROS) were generated by electrolysis (10 mA, 400 V, 3 min [29]) of 3 mL of modified Krebs-Henseleit (KH) buffer solution (in mM: NaCl 118, KCl 4.8, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgSO<sub>4</sub> 0.86, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 2.54, glucose 11 and EDTA 0.027). The electrolysis cell contained 2.7 mL of KH buffer in the presence of 0.3 mL of different concentrations of the copper complex or ligand. A volume of 0.2 mL of the electrolyzed (ELS) solution (ELS KH buffer + complex or ligand) was then added to 0.8 mL of 25 mg/mL DPD solution. The electrolysis-generated ROS react rapidly with DPD forming an oxidation product with a specific absorbance at 515 nm [20,30]. In the presence of antioxidant molecules, ROS may be neutralized and thus unavailable to react with DPD. The antioxidant capacities of ligands and complexes were expressed as a percentage of ROS still remaining in the ELS solution and was calculated according to the following equation:

$$\%ROS = A_{\text{sample}}/A_{100\%ROS} \times 100$$

where  $A_{100\%ROS}$  is the absorbance of ELS KH buffer containing DPD (100% amount of ROS in solution) and  $A_{\text{sample}}$  is the absorbance of ELS KH buffer containing DPD and in the presence of the copper complex or ligand.

#### 2.4.2. 1,1-Diphenyl-2,2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity

DPPH is a stable free radical (DPPH $\cdot$ ) characterized by an absorption band at about 517 nm. In the presence of a substance that can donate a hydrogen atom, DPPH is reduced by losing its violet color. The DPPH assay was performed in conditions of Marinova et al. [31]. The DPPH reagent was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A solution of 0.5 mM DPPH was prepared and its absorbance was approximately 0.7 at 517 nm. A volume of 0.2 mL of sample (copper(II) complexes or ligands) was added to 1.8 mL of DPPH solution. After

30 min, the absorbance was measured at 517 nm. The percentage of scavenged DPPH radical was calculated as follows:

$$\%DPPH = (A_{\text{tr}} - A_{\text{tr}})/A_{\text{tr}} \times 100$$

where  $A_{\text{tr}}$  is the absorbance before reaction and  $A_{\text{tr}}$  is the absorbance after reaction with the antioxidant (complex or ligand).

### 2.5. Neuronal cell culture and treatment

Mouse P19 embryonic stem cells were differentiated to neurons by exposure to 0.5  $\mu$ M all-trans-retinoic acid for 4 days [32,33]. On day 4, an amount of  $3.8 \times 10^5$  neurons were seeded in gelatinized 12 well-plates containing supplemented Neurobasal (SNB) medium [Neurobasal containing 2% v/v B27 supplement (Fisher Scientific, St-Laurent, QC, Canada), 0.5 mM L-glutamine, 50 U/mL penicillin and 50 U/mL streptomycin].

Neuron treatment with His, Ser, urea or biuret ligands as well as with their copper(II) complexes and CuCl<sub>2</sub> began on day 4, concomitantly with cell seeding into the SNB medium. The eight studied agents (ligands and corresponding Cu(II) complexes) were freshly solubilized in phosphate buffer saline (PBS) as 10-fold concentrated stock solutions and added individually to the culture medium at the indicated final concentrations. After 48 h of incubation (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), cultures were analyzed for cell viability. Control cultures contained only the cells in SNB medium.

### 2.6. Cell viability

Cell viability was determined by the Neutral Red (NR) uptake assay as recently described [34]. One mL of freshly prepared NR solution (138  $\mu$ M in 20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM D-glucose, pH 7.2) was added to each culture well pre-washed delicately with PBS. After 2 h incubation (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), NR solution was removed and cultures were washed rapidly with 1% formaldehyde-1% calcium chloride. Then, 1 mL of NR eluent (EtOH:H<sub>2</sub>O:acetic acid 50:49:1) was added to extract the NR from cells. After 10 min agitation at room temperature, the absorbance was read at 540 nm using an ELX800 UV universal microplate reader. The 100% viability was established with control (untreated) cultures. Assays were done in duplicate using three independent cell cultures.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Chemical analysis of copper complexes

The elemental analysis of copper complexes prepared in isopropanol as well as their physical properties (color, molecular weight and melting point) are presented in Table 1. The results of elemental

**Table 1**  
Analytical and physical data of the Cu (II) complexes of Ser, His, Urea and Biuret.

Compound	Formula	Elemental analysis <sup>a</sup> % found (% calc.)			Color	MW <sup>b</sup> g/mol	MP °C
		C	H	N			
[Cu(His) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> CuN <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	30.74 (32.34)	3.96 (4.05)	17.96 (18.29)	Light blue	444.00	185 ± 1.6
[Cu(Ser) <sub>2</sub> ]	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> CuN <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	26.28 (26.49)	4.35 (4.46)	16.08 (16.33)	Navy blue	271.72	186 ± 0.6
[Cu(Urea) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> CuN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	9.23 (9.42)	3.23 (3.14)	23.61 (21.99)	Blue-green	254.56	161.6 ± 2.1
[Cu(Biuret) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> CuN <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	14.59 (14.11)	2.98 (2.94)	25.02 (24.67)	Blue-green	340.61	171.6 ± 1.1

MP, melting point.

<sup>a</sup> The calculated values of elemental analysis are given in parentheses.

<sup>b</sup> The MW were determined from the formula calculated from elemental analysis.

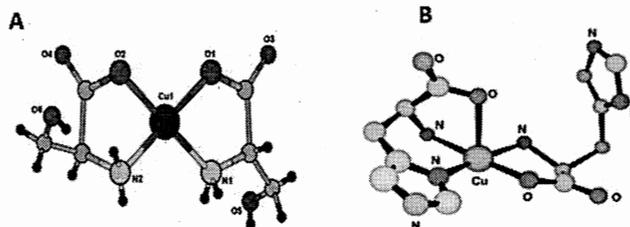


Fig. 1. Structure of  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  bidentate obtained from crystal X-ray diffraction (A) and of tridentate  $[\text{Cu}(\text{His})_2]$  complex as elucidated in [5].

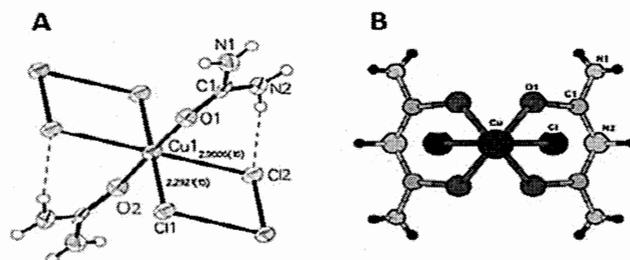


Fig. 2. Structure of  $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$  obtained from crystal X-ray diffraction (A) and molecular structure proposed for  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  complex (B).

analysis as well as the proposed chemical formula were in good agreement with the expected stoichiometry (Table 1). The melting points of copper complexes were similar to those of previous investigations [14,35].

The chemical formula of  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  complex was corroborated by mass spectroscopy (data not shown). In dry phase (as powders), the complexes are stable in air, easily soluble in water, and insoluble in alcoholic media.

### 3.2. X-ray crystal structure of copper complexes

Only  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$  generated adequate crystal for X-ray analysis. The  $[\text{Cu}(\text{His})_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  data were from references Deschamps et al. [36] and Freeman et al. [37], respectively.

The X-ray structural analysis of single crystals of  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  complex revealed two serine molecules each bound to the copper ion in a bidentate manner (Fig. 1A). In amino acids with non-coordinating side chains, the more common mode of coordination is bidentate chelation [38]. The structure of  $[\text{ML}_2]$  species showed that two amino nitrogen ( $\text{N}_{\text{am}}$ ) and two carboxyl oxygen ( $\text{O}_{\text{carboxyl}}$ ) are coordinated to the copper (II) ion (Fig. 1A). The mode of coordination around the copper(II) center is a square pyramid that gives rise to the more thermodynamically stable five-membered chelate rings (Fig. 1A). The length values of the Cu–O (1.97 Å) and Cu–N (2.00 Å) bonds in this study are in good agreement with the previously published theoretical values for this complex [39,40]. According to the elemental analysis (Table 1), chloride atoms are not present in structure of  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  complex, differing from the other copper complexes of this study. This could be due to several factors influencing the structural arrangement, including metal–ligand bond strength, stereochemistry of the complex and proton displacement reactions [41].

In the case of  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  prepared in conditions similar to those described for  $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$  by Pop et al. [25], we did not obtain single crystals. However, the X-ray patterns of our preparation showed structures similar to those of other related complexes previously

described [36,42].

A neutral five-coordinated complex ( $[\text{Cu}(\text{His})_2]$ ) was described by Deschamps et al. [36]. This study proposed a distorted square pyramidal geometry with bidentate and tridentate L-histidine ligands (Fig. 1B). On the other hand, the crystal X-ray diffraction structure of another  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  complex obtained by Bujacz et al. [42] showed copper coordinated (semi-coordination) by one histidine only, in a bidentate manner involving the carboxyl ( $\text{O}_{\text{carboxyl}}$ ) and the amine ( $\text{N}_{\text{am}}$ ) from the main chain group of His. Two additional chloride anions completed the square coordination of the central  $\text{Cu}^{2+}$ . The structures reported by Deschamps et al. [36] and Bujacz et al. [42] are not in agreement with the chemical formula ( $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{CuN}_6\text{O}_4$ ) found from elemental analysis in the present study. We have obtained a different copper histidine complex consistent with two molecule of His and two atoms of chloride bound to the central  $\text{Cu}^{2+}$  cation as  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ .

The crystallographic investigation of the urea complex,  $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$ , revealed a chain structure, with the chloride ions acting as bridges as shown in Fig. 2A. The Cu(II) ions are hexacoordinated by two chloride bridges and by the oxygen atoms from two urea molecules, showing an elongated octahedral stereochemistry. The apical positions seem occupied by two semi-coordinated chloride bridging ligands (Cu1–Cl1 = 2.96 Å); the equatorial plane consists of two urea ligands and two chloride bridges (Cu1–Cl1 = 2.29 Å) (Table 2).

The Cu1–Cl1 distance (2.96 Å) seems too large for a covalent binding ( $r_{\text{Cl}} = 0.99 \text{ \AA}$ ) and is more consistent with an ionic bonding ( $r_{\text{Cl}^-} = 1.84 \text{ \AA}$ ,  $r_{\text{Cu}^{2+}} = 0.81 \text{ \AA}$ ) [42]. Although urea has two potential electron donor atoms in its structure ( $\text{O}_{\text{carboxyl}}$  and  $\text{N}_{\text{am}}$ ), copper is frequently coordinated only through the oxygen atom in a monodentate pattern and the C=O–M angle is often smaller than  $180^\circ$  [43,44]. To the best of our knowledge, the crystal structure ascribed to  $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$  is novel.

As for  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ , the crystallisation of  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  has not been successful in isopropanol. Therefore, a possible structure for this complex is proposed (Fig. 2B) on basis of the crystal X-ray diffraction previously described by Freeman et al. [37], which is in accordance

**Table 2**  
Bond lengths for [Cu(Urea)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>].

Atom	Atom	Length (Å)
Cu1	Cl1 <sup>a</sup>	2.9605(16) <sup>a</sup>
Cu1	Cl1	2.2921(15)
Cu1	Cl1 <sup>a</sup>	2.9605(16)
Cu1	Cl1 <sup>a</sup>	2.2921(15)
Cu1	O1	1.955(4)
Cu1	O1 <sup>a</sup>	1.955(4)
O1	Cl1	1.262(9)
N1	Cl1	1.224(8)
N2	Cl1	1.345(9)

<sup>a</sup> The numbers in parentheses in this column refer to the unit cell defined by Bernal and Fowler [65].

**Table 3**  
Structural features of the first coordination shell of copper for the four copper (II) complexes.

Complexes	Coordination binding	Involved atom	Distance Cu-X (Å)	Reference
[Cu(His) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	Tridentate	N <sub>am</sub>	2.003	[11] <sup>a</sup>
		N <sub>im</sub>	1.984	
		O <sub>carbonyl</sub>	2.277	
[Cu(Ser) <sub>2</sub> ]	Bidentate	N <sub>am</sub>	2.001	This work
		N <sub>im</sub>	1.972	
		O <sub>carbonyl</sub>	1.955	
[Cu(Urea) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	Monodentate	O <sub>carbonyl</sub>	1.955	This work
[Cu(Biuret) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	Bidentate	O <sub>carbonyl</sub>	1.982	[44]

<sup>a</sup> Reference describes [Cu(His)<sub>2</sub>].

with our elemental and FTIR analyses (Table 1 and cf. Section 3.3 below). In the [Cu(Biuret)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] complex, the copper atom has a coordination number 6 and a tetragonally distorted octahedral environment [37]. Its binding to the four oxygen atoms of ligands is covalent, as indicated by the Cu–O bond lengths while the Cu–Cl distances revealed ionic bonding between Cl<sup>−</sup> and Cu<sup>2+</sup> ions, similar to those found for urea copper complexes [37]. The biuret molecules act as bidentate chelates via their oxygen atoms [37]. The coordination data and structural features of the four copper(II) complexes are summarized in Table 3.

### 3.3. FTIR characterization of copper complexes and ligands

FTIR pattern of [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] showed changes in the positions and profiles of some bands compared to that of free His (Fig. 3A, B). Generally, in amino acids, NH stretching vibration is observed in 3130–3030 cm<sup>−1</sup> region [45]. Theoretically, in metal complexes, their NH stretching vibration (νNH<sub>3</sub><sup>+</sup>) should disappear due to coordination [46]. In the metal complexes, however, a band was observed at 3300 cm<sup>−1</sup>, which could arise from other vibrations appearing in this region [47]. Free His shows the antisymmetric COOH stretching frequency at 1634 cm<sup>−1</sup> (Fig. 3B), and [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] exhibits this band at 1616 cm<sup>−1</sup> (Fig. 3A). This shift in the stretching frequency is consistent with the findings of Sarkar and Wigfield [48] who observed a similar shift for [Cu(His)<sub>2</sub>] and other Cu(II)-amino acid complexes. These results indicate the participation of the amino acid groups in copper coordination and the tridentate chelation pattern of [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] complex.

Fig. 3 (C, D) shows the FTIR spectra for [Cu(Ser)<sub>2</sub>] and serine. The bands between 3444 and 3259 cm<sup>−1</sup> assigned to the NH stretching vibration in the spectrum of the amino acid are observed almost at the same respective frequencies in the [Cu(Ser)<sub>2</sub>] spectrum. The NH stretching vibration bands of Ser (at 3346 and 3258 cm<sup>−1</sup> respectively) are shifted to higher wavenumbers (3481–3398 cm<sup>−1</sup>) in metal complex [49]. These results clearly suggest deprotonation of the NH<sub>3</sub><sup>+</sup> group of the Ser molecule and binding to the metal ion through its

nitrogen atom [50]. On the other hand, the Ser absorption bands at 1640 and 1601 cm<sup>−1</sup> (corresponding to the C=O stretching bond) are shifted to the lower wavenumbers (1631 and 1587 cm<sup>−1</sup>) in the [Cu(Ser)<sub>2</sub>] spectrum. Moreover, the symmetric (M–N) stretching band appearing at 523 cm<sup>−1</sup> in this study is in agreement with previous studies [49]. Altogether, these observations indicate that Ser binds the metal ion via its carboxyl and amino groups.

Fig. 3 (E, F) presents the FTIR spectra obtained for urea and [Cu(Urea)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]. The bands between 3444 and 3259 cm<sup>−1</sup> assigned to the NH stretching vibration in the spectrum of urea are observed almost at the same respective frequencies in the [Cu(Urea)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] spectrum. However, the intense absorption bands for urea at 1680 and 1602 cm<sup>−1</sup>, corresponding to the C=O stretching and to the NH<sub>2</sub> bending vibrations, are shifted to lower frequencies (1616 and 1576 cm<sup>−1</sup>) in the spectrum of the complex. This may indicate a possible implication of oxygen from the carbonyl group of urea in the coordination with copper (II) ions [43]. This is also supported by the 419 cm<sup>−1</sup> band corresponding to M–O vibration [20,44] in [Cu(Urea)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] spectra.

The FTIR spectra of biuret and [Cu(Biuret)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] complexes are shown in Fig. 3 (G, H). The bands ascribed to the NH stretching vibration observed in the [Cu(Biuret)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] spectrum are similar but not identical to the bands in the range of 3458–3016 cm<sup>−1</sup> observed in the spectrum of free biuret. This might indicate that probably not all nitrogens are involved in the formation of the complex. A symmetric vibration frequency of C=O stretching appears near 1718 cm<sup>−1</sup> in the biuret spectrum (Fig. 3H). When coordination occurs, a shift of the C=O stretching mode to lower wavelength was reported [22] indicating that coordination could be produced with participation of the oxygen [43]. In fact, a vibration band in the [Cu(Biuret)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] complex was detected at 1679 cm<sup>−1</sup> (Fig. 3H). As in the case of [Cu(Urea)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] complex, the presence of a 490 cm<sup>−1</sup> band ascribed to M–O vibration suggests the participation of oxygen in a coordinative complexation between biuret and copper(II) ion fitting well previous data of Wang et al. [22]. Overall, the FTIR results are in accordance with the structures depicted (Figs. 1, 2).

### 3.4. Stability of copper complexes in physiologically-relevant media

Evaluation of the stability of copper complexes in physiologically relevant conditions will help in the design of their pharmaceutical formulations. As oral administration of copper complexes will be eventually sought in treatment of cardioencephalomyopathy and in Menkes disease, it was of interest to explore their stability in conditions simulating the gastric and intestinal system. Absorbance spectra and cyclic voltammetry were used as indications of structural conformation of studied complexes in various media. Fig. 4 shows the UV-Vis spectra of the copper(II) complexes incubated for 2 h, at room temperature, in H<sub>2</sub>O, SGF (pH 1.2), SIF (pH 7.2), and in physiological saline solution 0.9% NaCl (pH 7.2).

#### 3.4.1. Stability at room temperature

The spectra of [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] in H<sub>2</sub>O, in physiological saline (0.9% NaCl) and in SIF showed maximal absorption at 620–640 nm (Fig. 4A). The absorption in SIF was about twice than that observed in H<sub>2</sub>O and in 0.9% NaCl, which could be attributed to the changes of pH. The addition of 20 mM copper(II)-histidine in H<sub>2</sub>O or in 0.9% NaCl media decreased the pH to about 5.32 whereas the final pH of the complex in SIF was 6.8, probably due to better buffering capacity. According to Deschamps et al. [11], distribution of the copper(II) histidine species differs as a function of pH. For instance, [MHL<sub>2</sub>] was found at pH 5 and below whereas [ML<sub>2</sub>] is found at pH 7. When the pH value is low (pH ≤ 5), the nitrogen of imidazole group (similarly to carboxyl) is protonated and thus it is no more involved in binding to copper(II); therefore 50% or more of copper may be unbonded. The presence or absence of the hydrogen atom would have influence on the absorbance properties. In SGF, absorption was maximal at 750 nm probably due to unbonded

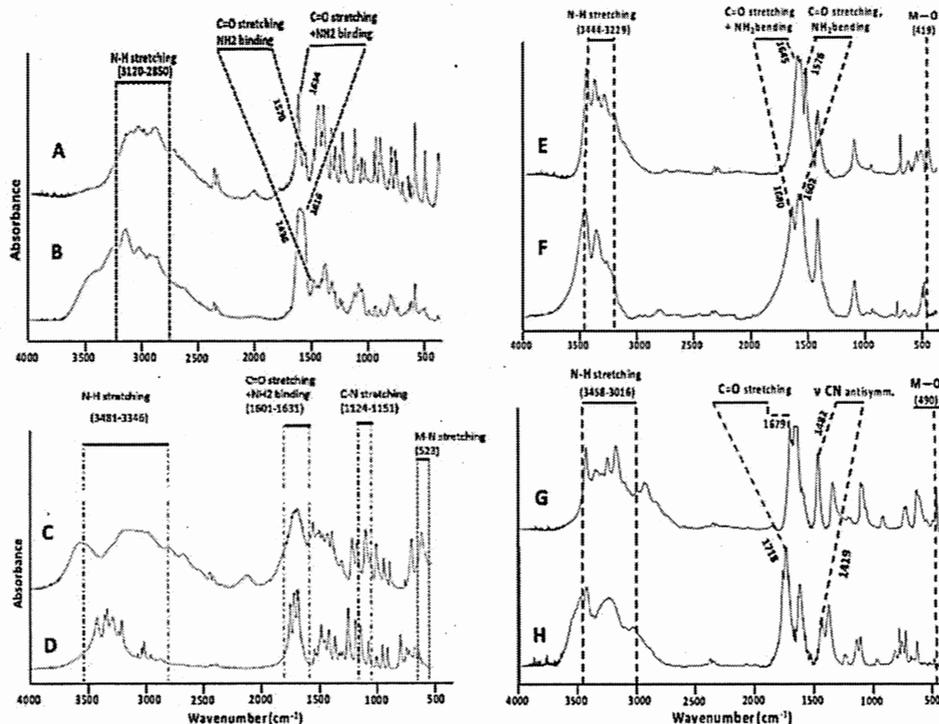


Fig. 3. FTIR spectra of  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  (A), His (B),  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  (C), Ser (D),  $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$  (E), urea (F),  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  (G) and biuret (H) in the wavenumber range of  $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ .

copper in view of Deschamps et al. [11] suggesting that at  $\text{pH} \leq 3.7$  most of the remaining ligand is unbound. At physiological pH, the major structure proposed for  $[\text{Cu}(\text{His})_2]$  in aqueous solution was  $[\text{ML}_2]$  [11]. Upon increase of pH ( $\text{pH} > 7$ ), the amine group is deprotonated to give a negatively charged ligand, and the addition of  $\text{HO}^-$  or the ionization of pyrrole-like nitrogen in the imidazole group may induce the complex to adopt, in basic medium, a  $[\text{ML}_2(\text{OH})]$  form which in our case may be  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{OH}]$ .

The addition of  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  did not change the pH of the four media. The spectra of this complex were similar in  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$  0.9%, and SIF with maximal absorption at 630 nm (Fig. 4B). However, in SGF, similarly to copper(II) histidine, the maximal absorption was at 750 nm, which could be attributed to protonation of coordinating groups and eventually to unbound copper.

The  $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  complexes showed a strong band in the visible light, similarly to amino acid copper complexes in acidic conditions. These data fit well those of Corradi [43]. The  $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$  spectra (Fig. 4C) were similar in  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.9%  $\text{NaCl}$  (neutral) and in acidic SGF, with maximal absorption at 810 nm. In SIF, the maximal absorbency was slightly shifted to 830 nm and with a markedly lower signal intensity (about 50% from that in 0.9%  $\text{NaCl}$ ) probably due to the presence of phosphate in SIF which can form a precipitate by the displacement of the two chloride anions generating copper(II) urea phosphate complex [51]. Similarly, the spectra of  $[\text{Cu}$

$(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  (Fig. 4D) in  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.9%  $\text{NaCl}$  and SGF exhibited maximal absorption at 810 nm and with various intensities of the signal in each medium. In SIF, the formation of a green precipitate was observed with  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$ , which may explain the disappearance of the signal at 810 nm. An absorption still observed in the 800–830 nm region (copper region) suggests a degradation of the complex and the presence of free copper ions.

#### 3.4.2. Cyclic voltammetry

Cyclic voltammetry measurements of each complex were carried out in physiological saline. Each complex (2 mM) showed a quasi-reversible response (Fig. 5). A background voltammogram in physiological  $\text{NaCl}$  saline (Fig. 5A) without the presence of a complex is shown for reference. The onset of the reduction, and mid-potential value of  $\text{CuCl}_2$ ,  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$  are quite similar, suggesting a small difference in their reduction potential (Fig. 5B). When compared with  $\text{CuCl}_2$ , urea and biuret copper complexes, the onset of reduction of both  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  is cathodically shifted, and displays weakly defined peak current values making assignment of a mid-potential value difficult (Fig. 5C). If the onset of reduction of each of the complexes is taken as an indication of stability, then based on the results from voltammetric measurements  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  have higher stabilities when compared with  $\text{CuCl}_2$ ,  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$  [52], in accordance with absorbance profiles.

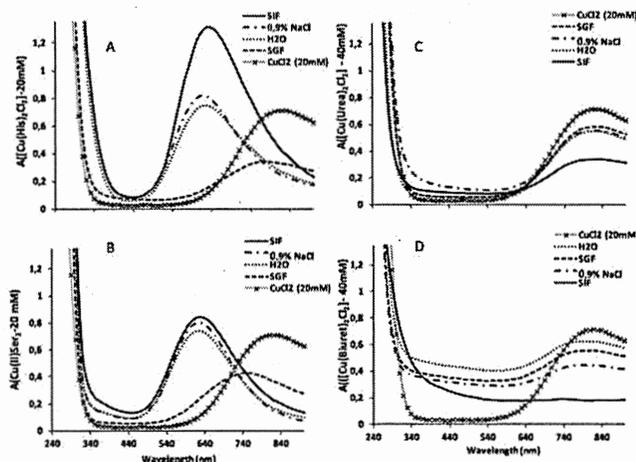


Fig. 4. UV-Vis absorbance spectra of  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  [A],  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  [B],  $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$  [C], and  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  [D] in different physiologically-relevant media:  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.9% NaCl (pH 7.4), SGF (pH 1.2), and SIF (pH 7.2), after 2 h at room temperature. The spectrum of aqueous solution of  $\text{CuCl}_2$  is included for comparison.

According to Deschamps et al. [11], the tridentate ligation confers greater stability compared to bidentate and monodentate ligations. Although the mode of coordination of Ser around copper (II) center is bidentate, the relative stability of the serine complex compared to that of the urea and biuret complexes could result from the thermodynamically stable five-membered chelate ring architecture. The differences in  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  spectra are due to the distribution of the copper(II) histidine species at different pH values [11].

### 3.4.3. Stability at 37 °C

The stability of the copper complexes in the different media was also evaluated by absorbance over 48 h at the physiological temperature of 37 °C (Fig. 6). The absorbance values at 630 nm of the histidine copper complex (Fig. 6A) in SIF, in water and in 0.9% NaCl were similar; the values gradually decreased with time up to 24 h and then remained constant. The absorbance value in SGF was constant and low throughout the whole period. The absorbance values of the serine copper complex (Fig. 6B) at 620 nm were similar in  $\text{H}_2\text{O}$  and 0.9% NaCl and constant up to 48 h. In contrast, the absorbance in SIF decreased rapidly from 1 to 0.3 after 2 h (probably due to the phosphate ions). The absorbance value was low initially and remained low during the whole interval up to 48 h, indicating a lower stability of  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  in SIF at 37 °C compared to room temperature.

In the case of the urea and biuret complexes, the spectral profiles at 37 °C (Fig. S1 in Supplementary data), like those at room temperature (Fig. 4), showed maximal absorbencies at 810–830 nm due to free copper(II). It was not surprising that the absorbances at this wavelength range remained almost constant in view of the instability of these complexes (Supplementary data, Fig. S2).

In conclusion, compared to urea and biuret copper(II) complexes, the amino acid, His and Ser, copper(II) complexes presented relatively higher stability at room temperature as well as over 5 h at 37 °C. The highest stability was seen for copper(II)-serine in  $\text{H}_2\text{O}$  and 0.9% NaCl media.

### 3.5. In vitro antioxidant capacity

Given the complexity of oxidative processes and the diversified hydrophilic and hydrophobic nature of the antioxidants, there is no a unique well-defined method for quantitative measurement of antioxidant activity. In most cases it is necessary to combine the responses of different and complementary tests in order to have an indication of the antioxidant capacity of a sample [53].

Practically, according to the reactions involved in the scavenging processes, the antioxidants can neutralize free radicals by two different mechanisms: Hydrogen Atom Transfer (HAT) and Single Electron

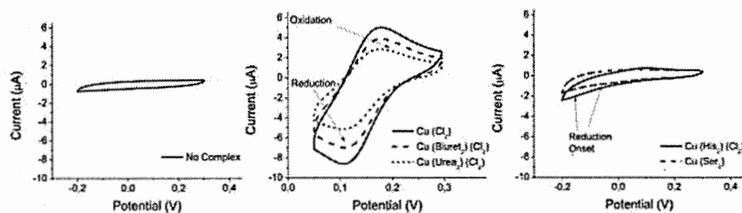


Fig. 5. Cyclic voltammery measurements of (A) background response of glassy carbon electrode (blank), (B)  $\text{CuCl}_2$  (control),  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$  and (C)  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ , in physiological NaCl saline. A saturated  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  reference electrode and a scan rate of 20 mV/s was used for all measurements.

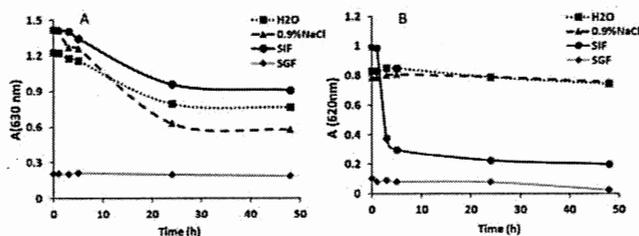


Fig. 6. Time course of absorbance values of  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  (A) and  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  (B) complexes at their  $\lambda_{\text{max}}$  and  $37^\circ\text{C}$ , and in different physiologically-relevant media (20 mM final concentration). Readings were taken at 0, 1, 2, 3, 5, 10, 24 and 48 h, and values are presented as means of three separate determinations. The 360–960 nm individual absorbance spectra are given in Fig. S1, in Supplemental data.

Transfer (SET) [54]. HAT-based methods measure the ability of an antioxidant to scavenge free radicals by H-atom donation. SET-based methods measure the capacity of an antioxidant to transfer one electron to reduce an oxidant, often associated to a change of color [29,55]. In the present study, the antioxidant capacities of the copper complexes and their ligands were evaluated by using two types of assays, the DPPH assay for the HAT mechanism and the DPD assay for the SET mechanism. The electrolysis of KH buffer (10 mA, 400 mV, 1 min) can generate ROS such as superoxide anion ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ), hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) and their by-products: hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and hypochlorite ion ( $\text{ClO}^-$ ) [53]. The generation of ROS is determined by the percentage of the oxidation of DPD. In the presence of the copper complexes or ligands, part of ROS may be scavenged leaving less of these species available to oxidize DPD.

Fig. 7 shows that all compounds have a certain capacity to scavenge ROS compared to the control condition (100% ROS). Kohen et al. reported that histidine and its derivatives having an imidazole group have an antioxidant activity due to hydrogen donation [56].  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  complex, at concentrations equal to or  $> 0.02\text{ M}$ , presented a higher scavenging activity than that of the ligand alone and of the other copper complexes (Fig. 7A). Differently, serine and urea copper complexes presented ROS scavenging capacities close to that of their free ligand (Fig. 7B, C). Interestingly, the antioxidant activity of  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  was about twice that of its free ligand (Fig. 7D) and about the same activity as that of urea and of  $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$ . The amide groups in the biuret and nitrogens of imidazole groups of His may act as efficient

electron donating groups to neutralize ROS.

The antioxidant capacity of copper(II) complexes and of their ligands were also evidenced by the DPPH assay which is recommended for compounds containing SH, NH and OH groups [57,58]. Fig. 8 shows that the eight compounds can scavenge DPPH $\cdot$ . Among the amino acids and their copper complexes,  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  exhibited the highest antioxidant capacity in comparison to histidine itself (Fig. 8A) and to the other copper complexes and ligands (Fig. 8B, C, D). The Biuret and  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$  (Fig. 8D) also exhibited antioxidant capacity but at concentration 10 to 20-fold higher than those of  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ . The ROS scavenging activities of  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  complex appear as concentration-dependent. Differently, in the case of  $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$  and of  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$ , as for their ligands, there were two steps: an initial strong scavenging capacity exerted at low concentration (0–0.5 M) followed by another step when the scavenging capacity was almost maintained at high concentration (up to 5 M, Fig. 8C, D). It has been reported that the reaction between an antioxidant and DPPH $\cdot$  apparently occurred in two steps [59,60]: (i) a fast step (1–2 min) essentially consisting in the abstraction of the most labile H-atoms from the antioxidant, and (ii) a slow neutralization step (30 min) reflecting a remaining activity on the oxidation/degradation products derived from the first step. It is now reported that Cu(II) complexes have the capacity to scavenge DPPH radical by hydrogen donation from the NH-groups, with the mention that the ascorbic acid, an antioxidant used as a standard (0.002–5 M), showed stronger antioxidant activity than that of synthesized copper complexes (data not shown). Worth to mention is

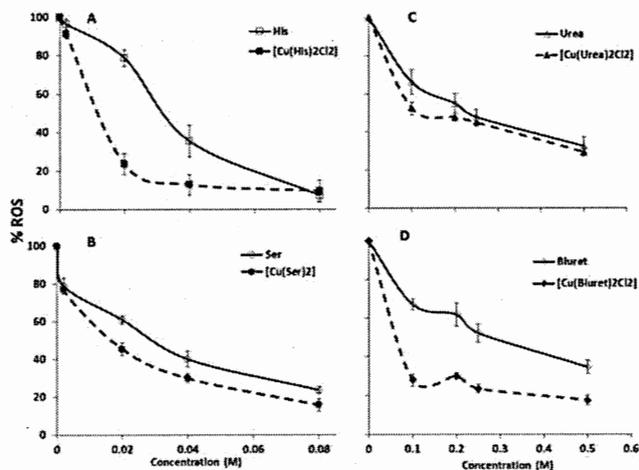


Fig. 7. The ROS scavenging capacity of copper complexes and of free ligands determined by the DPD assay. The antioxidant capacities are inversely related to the percentages of remaining ROS after electrolysis of KH solutions in the presence of the indicated concentrations of copper(II) complexes or ligand. Notice the different concentration scales between A, B (0.002–0.08 M) and C, D (0.1–0.5 M). Values are presented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ).

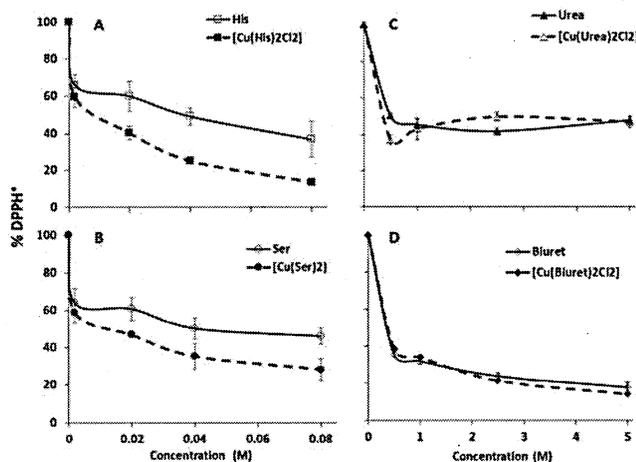


Fig. 8. The free radical scavenging capacity of copper complexes and free ligands evaluated by the DPPH assay. The antioxidant capacities are inversely related to the percentages of remaining DPPH• in the presence of the indicated concentrations of the copper(II) complexes or ligands. Notice the different concentration scales between A, B (0.002–0.08 M) and C, D (0.5–5 M). Values are presented as mean  $\pm$  SEM (n = 3).

that for the investigated copper complexes, as for their ligand, data obtained with the DPPH method also were in agreement with those of DPD method. Complexation with Cu(II) can modulate the feature of the amino acids and influence the antioxidant capacity. In the case of histidine, copper complexation markedly increased this capacity, whereas for [Cu(Ser)<sub>2</sub>] this increase was lower. No differences were found for [Cu(Urea)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] and for [Cu(Biuret)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] in comparison with their ligands. Probably due to their lower stability the [Cu(Urea)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] and [Cu(Biuret)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] complexes may lose the Cu<sup>2+</sup>, liberating thus the ligands. The urea and biuret alone also exhibit marked radical scavenging capacity. These observations are in agreement with previous data on urea as antioxidant and as cardioprotector [20].

### 3.6. Biocompatibility of copper complexes and ligands

The biocompatibility was evaluated using P19 neuronal cultures and the NR assay [34] which was recommended for measuring the viability of cells exposed to concentrations of copper compounds exceeding those of physiological copper.

Histidine and urea presented good biocompatibility in concentrations up to 0.4 mM (Fig. 9A, C). The good biocompatibility of urea is in line with urea levels of 2.3–6.5 mM encountered in normal adult human brain [61]. Serine and biuret caused a concentration dependent moderate loss of viability at 400  $\mu$ M concentration, with a remaining viability of about 70% in both cases (Fig. 9B, D). The cytotoxicity of serine could be due to the racemisation by a neuronal serine racemase of L-Serine into D-Serine known to be involved in neurodegeneration [62]. In contrast to urea, biuret was found to induce a decrease of viability (Fig. 9D). This cytotoxicity could be due to the transformation of biuret into products different from urea or to an eventual stronger chaotropic action compared to urea. However, the metabolic action of biuret in neuronal cells is still unknown.

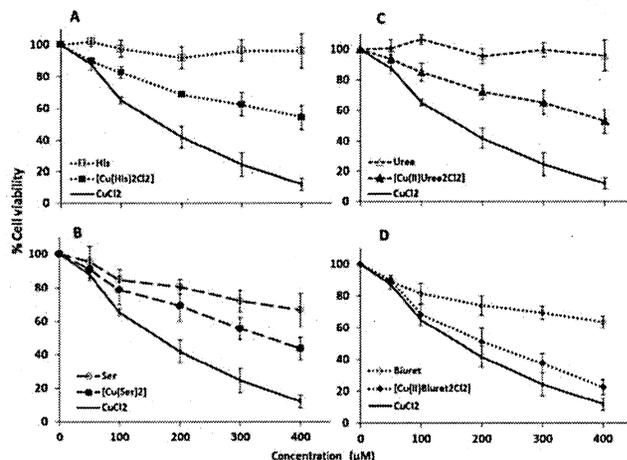
The normal physiological concentration of copper in brain parenchyma is 70  $\mu$ M, and concentrations up to 1300  $\mu$ M were found in the brain of patients affected by Wilson's disease [63]. Our findings of markedly decreased neuronal viability in the presence of CuCl<sub>2</sub> concentrations of 100 up to 400  $\mu$ M (Fig. 9) are in line with these data. Copper toxicity in cell culture is well known and can be attributed to its

capacity to generate ROS. Worth of note, all copper complexes were less toxic to neurons than equivalent CuCl<sub>2</sub> concentrations (Fig. 9).

Compared to free histidine, serine, urea and biuret, the corresponding copper complexes induced a loss in cell viability in a concentration dependent manner (Fig. 9). In retrospective, [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], [Cu(Ser)<sub>2</sub>] and [Cu(Urea)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] showed similar biocompatibility with P19 neurons (70% cell viability at 200  $\mu$ M) while the toxicity of [Cu(Biuret)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] was close to that of CuCl<sub>2</sub> (about 50% cell viability at 200  $\mu$ M), in line perhaps with the low stability of this complex. Therefore, [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], [Cu(Ser)<sub>2</sub>], [Cu(Urea)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], [Cu(Biuret)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] but not His and urea, moderately altered neuronal viability. It is not excluded that the bidentate [Cu(Ser)<sub>2</sub>] and [Cu(Biuret)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] and also the monodentate [Cu(Urea)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] copper complexes could release copper ions in the culture medium resulting in alteration of the environmental pH, generation of ROS, and promotion of apoptosis and DNA damages [64]. In contrast, the tridentate [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] complex presented a good antioxidant activity and, in addition, a moderate cell viability loss up to 200  $\mu$ M. The cytotoxicity of the synthesized copper (II) complexes was lower compared to equivalent concentrations of CuCl<sub>2</sub>. Although [Cu(Urea)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] appeared less stable than [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], the loss of viability was similar in both cases. It is not excluded that urea, which has an excellent antioxidant capacity [this report and 20] could protect cells against eventual oxidative damage due to the *in situ* liberation of copper (II) prooxidant. Among the studied compounds, [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] had the best cell biocompatibility and pronounced *in vitro* ROS scavenging activity.

### 4. Conclusion

Four copper complexes: [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], [Cu(Ser)<sub>2</sub>], [Cu(Urea)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] and [Cu(Biuret)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] have been synthesized in isopropanol and they structurally exhibited tridentate (His), bidentate (Ser and Biuret) or monodentate (Urea) coordination with copper(II). Furthermore, *in vitro* antioxidant activity of all copper complexes presented effective scavenging of radicals when tested with DPD and DPPH assays. The results of biocompatibility studies showed that they may affect, in a concentration-depend manner, the neuronal viability but to a lesser extent than does CuCl<sub>2</sub>. The copper complexes of amino acid ligands



**Fig. 9.** Cell viability in the presence of different concentrations of copper complexes and ligands. P19 neurons were incubated for 48 h in the presence of each complex or corresponding ligand, and their viability was evaluated by the NR uptake assay and reported as percentages from that of control cultures (no complex and no ligand). The viability of cells treated with  $\text{CuCl}_2$  was included for comparison. Values (mean  $\pm$  SEM) are for three independent cell cultures.

(His, Ser) presented higher stability in different simulating physiological media than those of urea and biuret, except Simulated Gastric Fluid in which all complexes were instable.  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ , closely followed by  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ , was stable, biocompatible and the best in terms of antioxidant capacity. The other copper complexes showed a relatively higher cytotoxicity, but much lower than that of  $\text{CuCl}_2$  generated by the free copper(II) ions.

#### Abbreviations

DPD	<i>N,N</i> -diethyl- <i>p</i> -phenylenediamine
DPPH	diphenyl-2,2-picrylhydrazyl
ELS	electrolysed
HAT	Hydrogen Atom Transfer
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
His	L-histidine
KH	modified Krebs-Henseleit
ML and ML <sub>2</sub>	M (metal), L (ligand)
MP	melting point
NR	Neutral Red
PBS	phosphate buffer saline
ROS	reactive oxygen species
Ser	L-serine
SET	Single Electron Transfer
SGF	Simulated Gastric Fluid
SIF	Simulated Intestinal Fluid
SNB	Supplemented Neurobasal (medium)

#### Acknowledgments

This work was supported by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (grant number 06912 to MAM and 105730 to JP) and by the Courtois Foundation, Canada. MGP held studentships from Pharmaqam and the Foundation of the Université du Québec à Montréal. The authors declare no conflict of interest.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.12.010>.

#### References

- [1] B.L. O'Dell, *Med. Clin. North Am.* 60 (1976) 687–703.
- [2] L. Bento, C. Feixoto, V.N. Zaitsev, P.F. Lindley, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 63 (2007) 240–248.
- [3] I. Bertini, L. Messoi, M.S. Viezzoli, G. Berthoin (Eds.), *Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids*, *Bioinorganic Chemistry*, vol. 1, Marcel Dekker, New York, 1995, pp. 156–174.
- [4] C.A. Fleming, *J.T. Fresco Water Air Soil Pollut.* 44 (1989) 143–158.
- [5] L. Gala, M. Lawson, K. Jomova, I. Zelenicky, A. Congradova, M. Mazur, M. Valko, *Molecules* 19 (2014) 980–991.
- [6] J.H.J. Stevens, W. Hangarter, *Inflammation* 2 (1977) 217–238.
- [7] S. Srivastava, P.J. Hoyer, A.A. Auldool, R.C. Hider, G.E. Mann, R.C. Siew, *Sci. Rep.* 6 (2016) 7.
- [8] R. Sas, H. Rohoita, J. Toldi, L. Vecsei, *J. Neurosci.* 257 (2007) 221–239.
- [9] L.M. Klevay, *Med. Hypotheses* 79 (2008) 802–807.
- [10] M.A. Mateescu, R. Chahine, S. Roger, B. Atanasiu, N. Yamaguchi, G. Lafumiere, *Arzneimittelforschung* 45 (1995) 476–480.
- [11] P. Deschamps, P.P. Kikkaroti, M. Gautam-Basak, B. Sackar, *Cosmet. Chem. Rev.* 249 (2009) 895–909.
- [12] M.S. Bukharov, V.G. Shyrylin, A. Mikhaylov, G.V. Mamina, S. Stupf, C. Matten, A.A. Strykova, A.N. Bin, N.Y. Senov, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2013) 9411–9421.
- [13] Z. Wu, F.A. Fernandez-Lima, D.H. Russell, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 21 (2010) 522–533.
- [14] H. Sigel, D.R. McCormick, *J. Am. Chem. Soc.* 93 (1971) 2041–2044.
- [15] A.E. Datta, T. Ghosh, K. Nayak, M. Ghosh, *Cases J.* 1 (2008) 158.
- [16] D.M. Danks, P.E. Campbell, B.J. Stevens, V. Mayne, E. Cartwright, *Pediatrics* 50 (1972) 188–201.
- [17] P. Freidinger, R. Horvath, C. Macmillan, J. Peters, M. Jaksch, J. Inherit. Metab. Dis. 27 (2004) 67–79.
- [18] M. Pecul, *Chem. Phys. Lett.* 427 (2006) 166–176.
- [19] B. Huchene, J.B. Klein, J.B. Vefusta, J.J. Doran, P. Rouillard, B.R. Roberts, A.A. McDonough, J.M. Sands, *Circ. Res.* 89 (2001) 133–145.
- [20] X. Wang, L. Wu, M. Assifien, M.A. Mateescu, R. Nadeem, R. Wang, *Be. J. Pharmacol.* 128 (1999) 1477–1484.
- [21] T.A. Carrier, D.W. Bohlanert, S.J. Falick, S.J. Bartle, *J. Anim. Sci.* 82 (2004) 1508–1517.
- [22] M.-L. Wang, G.-Q. Zhong, *L. Chem. Int. J. Opt.* 2 (2016) 1–8.
- [23] Z. Yingli, T. Ning, T.M. Yu, G.W. Dinbo, *Chinese J. Inorg. Chem.* 3 (1986) 89–95.
- [24] S.G. Baptis, J. Anastassopoulos, T. Theophanides, *Theor. Chem. Accounts* 105 (2000) 156–164.
- [25] V. Pop, A. Kriza, M. Hic, *An. Univ. Bucuresti. Chim.* 2 (2002) 63–68.
- [26] O.V. Dolomany, L.J. Bourhis, R.J. Gildea, J.A.K. Howard, H. Puschmann, *J. Appl. Crystallogr.* 42 (2009) 339–341.
- [27] G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. A* 64 (2008) 112–122.
- [28] G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. A* 71 (2015) 3–8.
- [29] C.V. Jackson, J.R. Mickelson, K. Stringer, P.S. Rao, B.R. Larchesi, *J. Pharmacol. Methods* 15 (1986) 305–320.
- [30] H.E. Moore, M.J. Garmentia, W.J. Cooper, *Environ. Sci. Technol.* 18 (1984) 346–353.

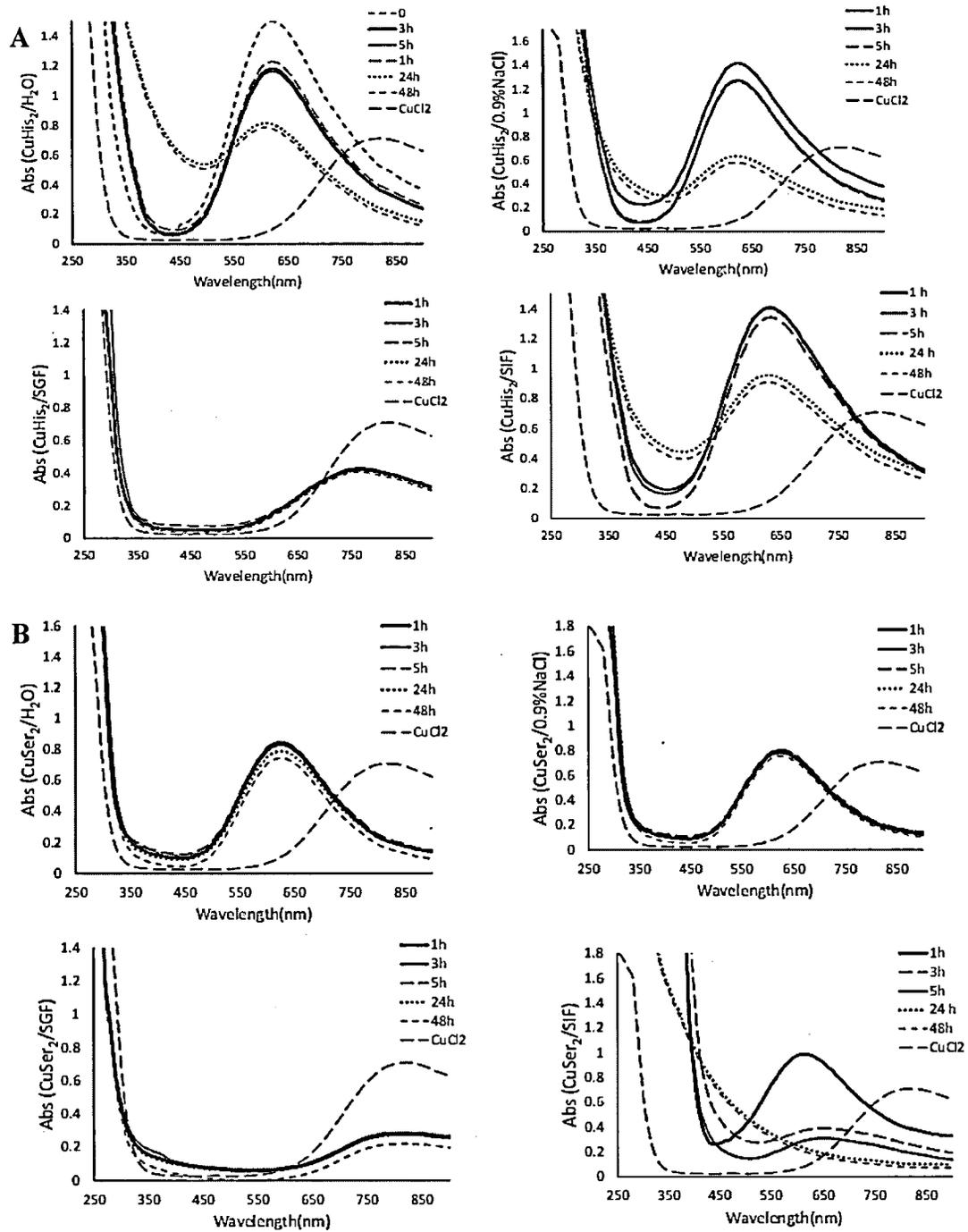
- [31] U. Marinova, V. Betscharov, *Bulg. J. Agric. Sci.* 17 (2011) 11–24.
- [32] P. Dachurina, D. Maltais, D. Desroches, M.A. Mateescu, *J. Paquin, Neuroscience* 167 (2010) 633–643.
- [33] D. Maltais, D. Desroches, M. Amullen, M.A. Mateescu, R. Wang, *J. Paquin, Neuroscience* 121 (2003) 73–82.
- [34] M. Gomez Perez, L. Fourcade, M.A. Mateescu, *J. Paquin, Anal. Biochem.* 535 (2017) 43–46.
- [35] S. Mandal, G. Das, H. Askari, *J. Mol. Struct.* 1081 (2015) 281–292.
- [36] P. Deschamps, P.P. Kulkarni, B. Sarkar, *Inorg. Chem.* 43 (2004) 3338–3340.
- [37] H.C. Freeman, J.E.W.L. Smith, J.C. Taylor, *Nature* 184 (1959) 707–710.
- [38] M.M. Harding, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60 (2004) 849–859.
- [39] I.S. Jem, D.S. Ahn, S.W. Park, S. Lee, B. Kim, *Int. J. Quantum Chem.* 101 (2005) 55–66.
- [40] G.D.S. Mandal, H.A. Askari, *J. Mol. Struct.* 1081 (2014) 281–292A.
- [41] A. Bonamantini Corradi, *Coord. Chem. Rev.* 117 (1992) 45–98.
- [42] Bujacz, M., Turck, W., Majzner, E. *Lodyga-Chruscinska, Russ. J. Coord. Chem.* 36 (2010) 430–435.
- [43] T. Thompharides, P.D. Harvey, *Coord. Chem. Rev.* 76 (1987) 237–264.
- [44] D. Gangopadhyay, S.R. Singh, P. Sharma, H. Mishra, V.K. Unnikrishnan, B. Singh, R.N. Singh, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomed. Spectrosc.* 154 (2016) 200–206.
- [45] Y. El Khoury, P. Hellwig, *J. Biol. Inorg. Chem.* 14 (2009) 23–34.
- [46] E.W. Wilson, M.H. Kauperian, R.B. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 5365–5372.
- [47] E. Pirelli, S. Berto, *J. Inorg. Biochem.* 88 (2002) 27–43.
- [48] B. Sarkar, Y. Wigfield, *J. Biol. Chem.* 23 (1967) 5572–5577.
- [49] S. Mandal, G. Das, H. Askari, *J. Chem. Inf. Model* 54 (2014) 2524–2535.
- [50] A.W. Herlinger, S.L. Wenhold, T.V. Long, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 6474–6481.
- [51] D.V. Nourmov, D.S. Yufit, E.V. Beldyrevaa, J.A. Howard, *Acta Crystallogr. C* 57 (2001) 790–792.
- [52] S. Daniele, M.J. Pena, *Electrochim. Acta* 38 (1993) 165–174.
- [53] D. Huang, B. Ou, R.L. Prior, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 1841–1856.
- [54] J.S. Wright, E.R. Johnson, G.A. Dhablio, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 1173–1183.
- [55] E. Niki, N. Noguchi, *BURMB Life* 50 (2005) 323–329.
- [56] R. Kohen, Y. Yamamoto, K.C. Cundy, B.N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 (1988) 3175–3179.
- [57] S. Cailliet, J. Côté, G. Dujon, J.F. Sylvaïn, M. Lacroix, *Food Res. Int.* 44 (2011) 1406–1413.
- [58] C. Popovici, I. Saykora, B. Tytkowski, *Rev. Génie. Ind.* 4 (2009) 25–39.
- [59] T.D. Zou, T.F. He, H.B. Li, H.V. Tang, E.Q. Xia, *Molecules* 21 (2016) 72.
- [60] K. Mishra, H. Cjha, N.K. Choudhury, *Food Chem.* 130 (2012) 1036–1043.
- [61] G. Decara, *Am. J. Med.* 110 (2001) 582–584.
- [62] H. Wolosker, E. Dumit, L. Balan, V.N. Feltya, *FEBS J.* 275 (2008) 3514–3526.
- [63] I.F. Scheiber, J.F. Mercer, R. Dringen, *Prog. Neurobiol.* 116 (2014) 33–57.
- [64] M. Jarzavacak Jembrek, J. Vlatnic, V. Radovanovic, J. Erhardt, N. Ornelic, *Biometals* 27 (2014) 1303–1322.
- [65] J.D. Bernal, R.H. Fowler, *J. Chem. Phys.* 1 (1933) 515–548.

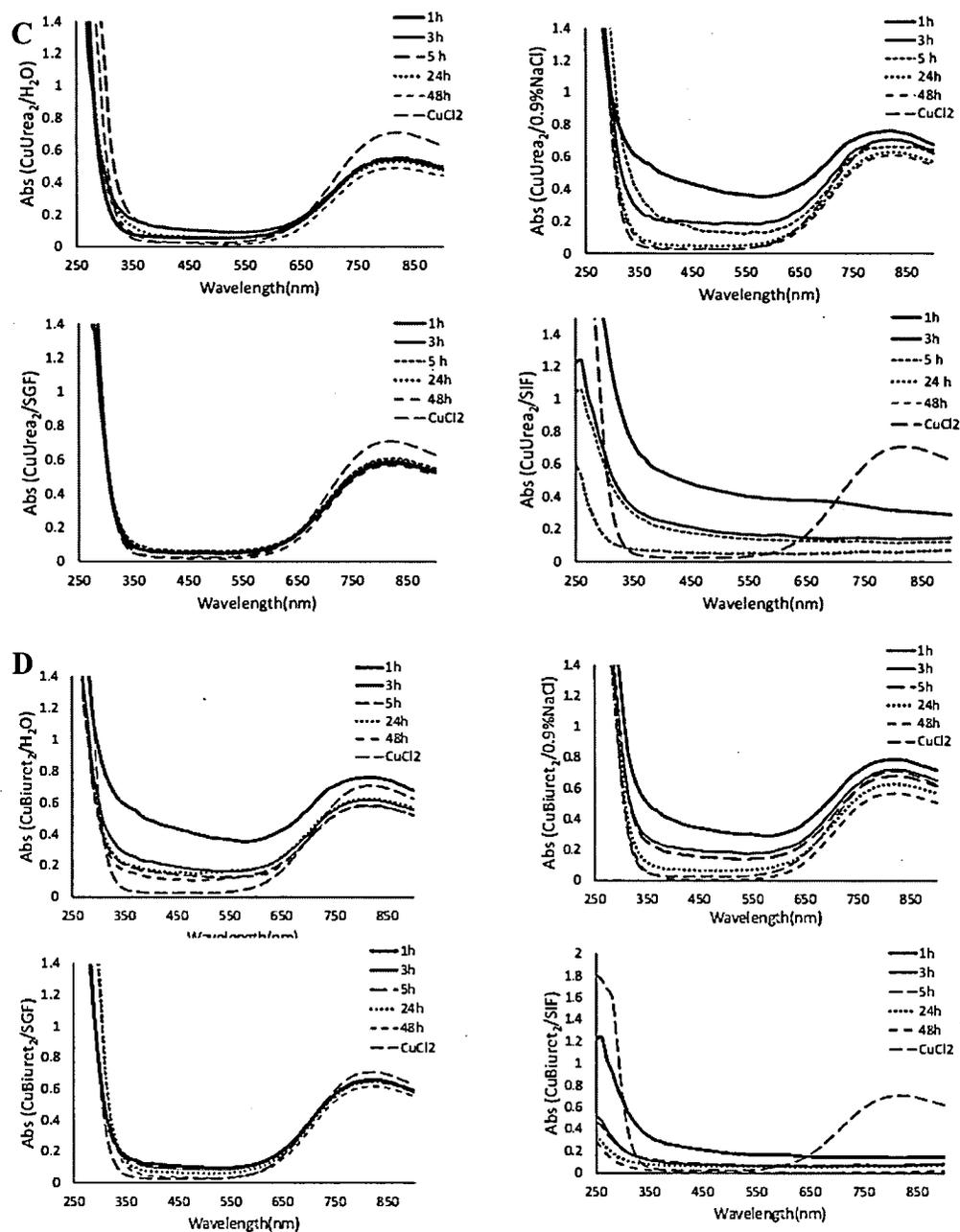
A.1S Données supplémentaires à l'article publié « copper complexes for biomedical application : structural insights, antioxidant activity and neuron compatibility »

Tableau S.1 Crystal data and structure refinement for [Cu(Ser)<sub>2</sub>] and [Cu(Urea)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>].

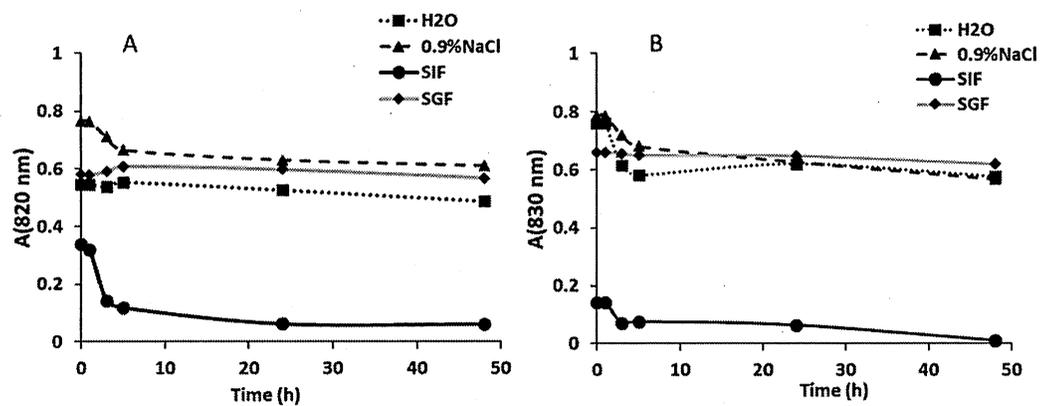
	[Cu(Ser) <sub>2</sub> ]	[Cu(Urea) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]
Temperature (°K)	100	100
Crystal system	monoclinic	monoclinic
Space group	<i>P2<sub>1</sub></i>	<i>P2<sub>1</sub>/n</i>
<i>a</i> /Å	5.6127(3) *	3.7887(2) *
<i>b</i> /Å	8.3523(5)	8.4675(4)
<i>c</i> /Å	9.9008(9)	12.4449(5)
<i>α</i> /°	90	90
<i>β</i> /°	90.506(2)	92.467(3)
<i>γ</i> /°	90	90
<i>V</i> /Å <sup>3</sup>	464.12(5)	398.87(3)
<i>Z</i>	2	2
$\rho_{\text{calc}}/\text{cm}^3$	1.944	2.120
$\mu/\text{mm}^{-1}$	12.822	18.698
<i>F</i> (000)	254.0	254.0
Radiation	GaK $\alpha$ ( $\lambda = 1.34139$ )	GaK $\alpha$ ( $\lambda = 1.34139$ )
Final <i>R</i> indexes [ <i>I</i> >= 2 $\sigma$ ( <i>I</i> )]	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.0355, <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0.0926	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.0509, <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0.1490
Final <i>R</i> indexes [all data]	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.0368, <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0.0934	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.0534, <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0.1498

\* The numbers in parentheses in this column refer to the unit cell defined by Bernal and Fowler (Bernal et Fowler, 1933).





**Figure S.1** UV-Vis absorbance spectra of [Cu(His)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] [A], [Cu(Ser)<sub>2</sub>] [B], [Cu(Urea)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] [C], and [Cu(Biuret)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] [D] in different physiologically-relevant media : H<sub>2</sub>O; NaCl 0.9% (pH 7.4); SGF (pH 1.2); and SIF (pH 7.2) Readings were taken at 0, 1, 2, 3, 5, 10, 24 and 48 h at 37 °C.



**Figure S.2** Time course of absorbance values of the complexes in different physiologically-relevant media, at their  $\lambda_{\text{max}}$  and 37 °C for 20 mM [Cu(Urea)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (A) and [Cu(Biuret)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (B). Readings were taken at 0, 1, 2, 3, 5, 10, 24 and 48 h, and values are presented as means of three separate determinations.

- A.2 Participation comme première auteure à des manuscrits en préparation pour soumission

**Synthesis and characterization of PVA/chitosan hydrogel cross-linked with different crosslinkers for biomedical application**

Ladan Esmaeili, Tien Le Canh, Joanne Paquin

and Mircea-Alexandru Mateescu

**Polyvinyl Alcohol-Chitosan modified by co-crosslinking with genipine and STMP for transdermal delivery**

Ladan Esmaeili, Tien Le Canh and Mircea-Alexandru Mateescu

## ANNEXES B

..RÉSUMÉS PUBLIÉS DES COMMUNICATIONS ORALES ET PAR AFFICHES

**Keystone symposia From Rare to Care: Discovery, Modeling and Translation of Rare Diseases (S4)**

11-14- November 2018 - Vienna BioCenter, IMP Lecture Hall - Vienna, Austria

**Copper complexes for biomedical applications: structural insights, antioxidant activity and neuron compatibility**

Ladan Esmaeili\* , Mariela Gomez Perez, Joanne Paquin, Pompilia Ispas-Szabo, Veronica Pop, Marius Andruh and Mircea Alexandru Mateescu

Introduction: Metal ions are involved in a wide range of biological intra and extracellular functions. Copper(II) coordinated with amino acid is essential to the function of many proteins and complexed with Histidine, as  $[\text{Cu}(\text{His})_2]$ , can treat the neurodegenerative Menkes disease.

Objectives: This study was aimed to coordinate copper with four small ligands (L-Serine, L-Histidine, Urea and Biuret) and evaluate stability, antioxidant activity and neuronal compatibility of the resulting complexes.

Methodology: Complexes were synthesized with  $\text{CuCl}_2$  and purified by precipitation in alcohol. Their structural features were analyzed by elemental composition, X-rays diffraction and FTIR. Stability was evaluated through UV-Vis absorbance profiles in

water, physiological saline, gastric-like and intestinal-like solutions. The antioxidant capacity was measured using DPPH (1,1-diphenyl-2,2-picrylhydrazyl) and DPD (N,N-diethyl-p-phenylenediamine) methods. Neuronal compatibility was assessed through cell viability measurements by the Neutral Red (NR) uptake assay using cultures of neurons derived from mouse P19 stem cells.

Results: The complexes were in the form of  $[\text{Cu}(\text{ligand})_2]$  and exhibited tridentate (L-Histidine), bidentate (L-Serine and Biuret) or monodentate (Urea) coordination with copper. All complexes and their ligands had antioxidant capacity, the  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  complex being the most potent. Contrarily to  $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$ , the  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  complexes were stable in different media including water, physiological saline and intestinal-like solutions. Although only  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  showed a good neurocompatibility (about 90% at concentrations up to 200  $\mu\text{M}$ ), the cytotoxicity of the other copper complexes was lower compared to equivalent concentrations of  $\text{CuCl}_2$ .

Conclusion: Copper complexes with amino acids, urea and biuret may act as radical scavengers. The  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  and  $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$  exhibited both the strongest antioxidant activity and highest cell viability of P19 neurons. The copper complexes influence cell viability in function of the ligand. These findings open new perspectives for the use of these copper complexes as antioxidants and possibly as therapeutic agents for neurodegenerative diseases. Furthermore, study of these complexes may help improve chelation therapy for copper dysfunction.

**20<sup>e</sup> Conférence du CBGRC.**

Université Concordia, Montréal , Canada du 18 November 2017

**Copper complexes with amino acids as bioactive agents for transdermal administration in treatment of certain neurodegenerative diseases**

L. Esmaeili\*, C. Le Tien , M.A. Mateescu, J. Paquin

There are very few treatments for neurodegenerative diseases generated by deficiency of copper (ex Menkes disease). Copper complexes with amino acids have been proposed as injectable forms but, their stability is low in aqueous solution.

**Objective:** Synthesis and characterization of copper aminoacid complex (L-histidine) and its inclusion in polymeric films for transdermal applications

**Methodology:** The structures of chitosan-PVA composite films with loading copper complex were characterized and their application properties, including permeability, water uptake and release characterization were assessed. Evaluation of biocompatibility and cytotoxicity of this films has been tested on P19 cells.

**Results:** The complex  $\text{Cu}(\text{His})_2$  well was incorporated in our biocompatible films such as revealed by FTIR and DSC. Composite films could provide suitable adhesive properties for TDDS application and a good capacity for copper complex loading and release (> 50%). The results of the viability of cells present that films with  $\text{Cu}(\text{His})_2$  have excellent biocompatibility and no obvious toxicity in vivo.

**Conclusion:** The preliminary results suggest that the use of the copper complex as therapeutic agents for transdermal administration in treatment of some neurodegenerative diseases.

7<sup>e</sup> Colloque de Pharmaqam  
Université du Québec à Montréal 31 Aout 2017

**Complexes de cuivre avec des acides aminés comme agents bioactifs  
administrables par voie transdermique pour le traitement de certaines maladies  
neurodégénératives**

L. Esmaili, C. Le Tien, M. A. Mateescu, J. Paquin

Il a y très peu de traitements pour des maladies neurodégénératives générées par une déficience de cuivre (ex maladie Menkes). Des complexes de cuivre avec d'acides aminés ont été proposés comme formes injectables mais, leur stabilité est faible.

**L'objectif** de ce projet est de développer des formes transdermiques capables d'assurer le transport et la stabilité des complexes de cuivre coordonnés avec des acides aminés (L-sérine et L-histidine).

**Méthodologie:** Préparation des films à base des polymères biocompatibles (polyvinyle alcool et chitosane) incluant des complexes de cuivre, puis caractérisé et analysé pour leur capacité à libérer les complexes de cuivre *in vitro* dans du tampon phosphate salin. L'évaluation de la toxicité des a été testée sur des cellules P19.

**Résultats :** Le complexe  $\text{Cu}(\text{His})_2$  a bien été incorporé dans nos films biocompatibles tel que révélé par FTIR et DSC. Le complexe a montré une bonne stabilité et une libération de plus de 50% durant une semaine. La viabilité des cellules en présence des films avec  $\text{Cu}(\text{His})_2$  est de 90% montrant une faible toxicité.

**Conclusion :** Les résultats préliminaires laissent entrevoir l'utilisation des complexes à cuivre étudiés comme agents thérapeutiques administrables par voie transdermique pour des maladies neurodégénératives.

**84<sup>e</sup> Congrès de l'Acfas.**

Université du Québec à Montréal du 9 au 13 mai 2016

**Complexes de cuivre avec propriétés antioxydantes**

Ladan Esmaeili\*, Pompilia Ispas-Szabo, Mircea Alexandru Mateescu

**Résumé**

Les complexes de cuivre avec les acides aminés sont utilisés dans de nombreux processus biologiques et peuvent être efficaces pour le traitement des différentes maladies.

L'objectif de ce projet est de développer des complexes de cuivre coordonnés avec divers ligands (L-sérine, L-histidine) et étudier leurs propriétés antioxydantes. Les complexes ainsi préparés seront formulés pour l'administration orale visant entre autres le traitement de troubles neurologiques.

Méthodologie: synthèse et purification des complexes, leur caractérisation structurale FTIR, UV-Vis absorption, diffractions par rayons X et l'analyse élémentaire. La capacité antioxydante a été évaluée en utilisant différentes méthodes pour doser l'activité de piégeage de radicaux libres ( $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{O}_2\cdot$ ) ou la décomposition de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Résultats : Les complexes  $\text{Cu}(\text{Ser})_2$  et  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  sont stables dans différents milieux : gastrique, intestinal et physiologique. Les deux complexes sont des piègeurs efficaces des espèces radicalaires ( $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{O}_2\cdot$ ) et ils ont la capacité de décomposer  $\text{H}_2\text{O}_2$ .  $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$  présente une plus forte activité d'élimination des radicaux libres par rapport au complexe  $\text{Cu}(\text{Ser})_2$ . Les résultats de l'activité antioxydante permettent de définir la spécificité de chaque méthode utilisée et proposer le mécanisme d'action des complexes étudiés.

Conclusion : On peut envisager l'utilisation des complexes à cuivre étudiés comme agents thérapeutiques pour maladies neurodégénératives ou comme agents antioxydants.

**18th Annual Chemistry and Biochemistry Graduate Research Conference.**

Université Concordia. 20 Novembre 2015.

**Copper complexes with antioxidant properties**

Ladan Esmaeili\*, Pompilia Ispas-Szabo, Mircea Alexandru Mateescu

**Abstract**

Cardiac dysfunctions were largely attributed to the adverse effects of reactive oxygen species (ROS). It has been reported that scavengers and antioxidants including copper proteins (ceruloplasmin and aminooxidase) and urea exert cardioprotective effects. This study proposes two coppers complex  $\text{Cu(II)Histidine}_2$  and  $\text{Cu(II)Ser}_2$  and the investigation of their radical scavenging activities. Each complex was synthesized and characterized structurally using spectral techniques (FTIR, X-Ray diffraction) and elemental analysis. Their antiradical activities were measured using the colorimetric method with N,N-diethyl-p-phenylenediamine (DPD) and the modified method TEAC (Trolox Equivalent Absorption Capacity) fast assay. The pro-oxidant species were generated by electrolysis. The results showed a good correlation between the concentration of the complexes and the anti-radical activity. The complex  $\text{Cu(II)Histidine}_2$  exhibited higher scavenging properties for free radicals compared with  $\text{Cu(II)Serine}_2$ . The data also supports the hypothesis of a mechanism based on proton transfer occurring in the studied systems.

## ANNEXES C

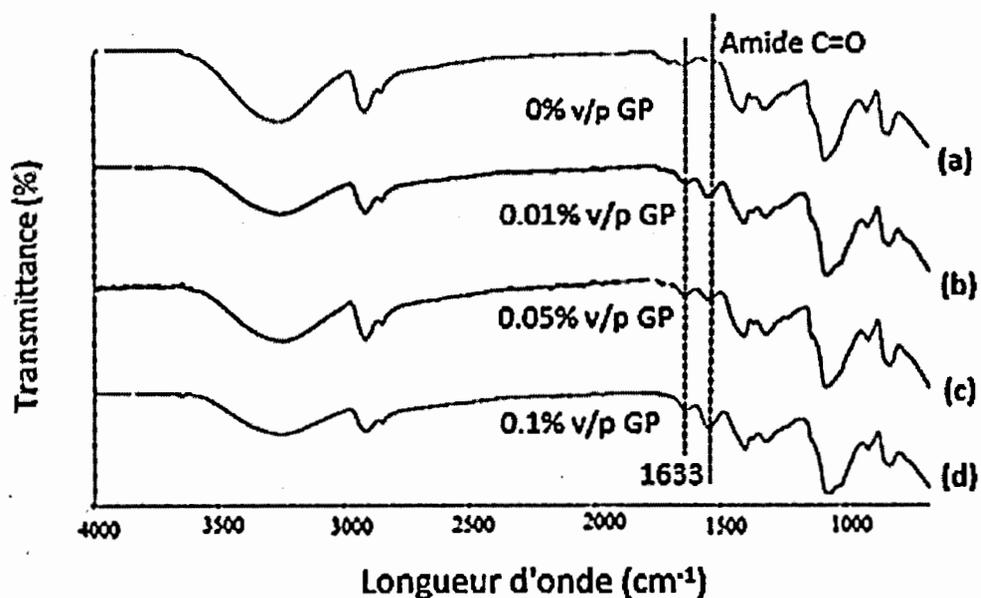
DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES AU SOUS-CHAPITRE 6.2 SUR LES  
CARACTÉRISATIONS DES MATRICES COMPOSITES PVA-CHITOSANE

Figure S.3 B) PVA-Ch (3-1) (a) PVA-Ch/M1 (sans traitement avec Gp) Gp de 0 % m/v (b) PVA-Ch/M2 GP de 0.01 % m/v; (c) PVA-Ch/M2 (Gp de 0.05 % m/v) et (d) PVA-Ch/M2 (Gp de 0.1 % m/v).

La Figure S.3 présente les spectres IR du film composite PVA-Ch (3-1) à 75 % de PVA et à 25 % de chitosane, à trois concentrations de réticulation chimique GP, 0.01 % m/v (courbe b), 0.05 % m/v (courbe c) et 0.1 % m/v (courbe d). La présence des pics

liés à l'amide formé par la réaction de réticulation des groupes carboxyle de génipine et amine du chitosane. De plus, une augmentation de l'intensité et un décalage de la bande associée aux vibrations de flexion du groupe  $\text{CH}_2$  à  $1406 \text{ cm}^{-1}$  sont observés et pourraient être dus à des liaisons chimiques covalentes survenues dans les groupes amine du chitosane au cours de la réaction de réticulation (Mathew et Kodama, 1992).

## BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, A. , Soloman, P.A. et Rejini, V.O. (2016). Preparation of Chitosan-Polyvinyl Alcohol Blends and Studies on Thermal and Mechanical Properties. *Proc Technol*, 24, p.741-748
- Adelstein, S. J. et Vallee, B. L. (1961). Copper Metabolism in Man. *New Engl J Med*, 265, p.892-897
- Agarwal, R. et Garcia, A. J. (2015). Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair. *Adv Drug Deliv Rev*, 94, p.53-62
- Akao, T., Kobashi, K. et Aburada, M. (1994). Enzymic studies on the animal and intestinal bacterial metabolism of geniposide. *Biol Pharm Bull*, 17, p.1573-1576
- Akram, M, Asef, M et Naveed, A. (2011). Amino acids: A review article. *J Med Plant Res*, 5, p.3997-4000
- Aktar, Betül, Erdal, S. Meryem, Sagirli, Olcay, Güngör, Sevgi et Özsoy, Yıldız. (2014). Optimization of Biopolymer Based Transdermal Films of Metoclopramide as an Alternative Delivery Approach. *Polymers*, 6, p.1350-1365

- Al-Tahami, K et Singh, J. (2007). Smart polymer based delivery systems for peptides and proteins. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 1, p.65-71
- Alhosseini, S. N., Moztarzadeh, F., Mozafari, M., Asgari, S., Dodel, M., Samadikuchaksaraei, A., Jalali, N. (2012). Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering. *Int J Nanomed*, 7, p.25-34
- Ali, A. et Ahmed, S. (2018). A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *Int J Biol Macromol*, 109, p.273-286
- Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B. et Weil, J. A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, p.551-562
- Ammar, H. O., Ghorab, M., Mahmoud, A. A., Makram, T. S. et Ghoneim, A. M. (2013). Rapid pain relief using transdermal film forming polymeric solution of ketorolac. *Pharm Dev Technol*, 18, p.1005-1016
- Apak, R., Ozyurek, M., Guclu, K. et Capanoglu, E. (2016). Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 2. Hydrogen Atom Transfer (HAT)-Based, Mixed-Mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and Lipid Peroxidation Assays. *J Agric Food Chem*, 64, p.1028-1045
- Asghari, F., Samiei, M., Adibkia, K., Akbarzadeh, A. et Davaran, S. (2017). Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 45, p.185-192

- Babusikova, E., Jurecekova, J., Evinova, A., Jesenak, M. et Dobrota, D. (2012). Oxidative Damage and Bronchial Asthma. Dans Ghanei, M. (dir.), *Respiratory Diseases*. United Kingdom : IntechOpen, p.1-28
- Balamurugan, K. et Schaffner, W. (2006). Copper homeostasis in eukaryotes: teetering on a tightrope. *Biochim Biophys Acta*, 1763, p.737-746
- Banyard, D. A., Bourgeois, J. M., Widgerow, A. D. et Evans, G. R. (2015). Regenerative biomaterials: a review. *Plast Reconstr Surg*, 135, p.1740-1748
- Barbusinski, K. (2009). Fenton reaction - Controversy concerning the chemistry. *Ecol Chem Eng S*, 16, p.347-358
- Bento, I., Peixoto, C., Zaitsev, V. N. et Lindley, P. F. (2007). Ceruloplasmin revisited: structural and functional roles of various metal cation-binding sites. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 63, p.240-248
- Benzie, I. F. et Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239, p.70-76
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A. et Gurny, R. (2004). Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm*, 57, p.35-52
- Bernal, J. D. et Fowler, R. H. (1933). A Theory of Water and Ionic Solution, with Particular Reference to Hydrogen and Hydroxyl Ions. *J. Chem. Phys*, 1, p.515-548

- Böhm, Fritz, Edge, Ruth, Land, Edward J., McGarvey, David J. et Truscott, T. George. (1997). Carotenoids Enhance Vitamin E Antioxidant Efficiency. *Journal of the American Chemical Society*, 119, p.621-622
- Borges, A. F., Silva, C., Coelho, J. F. et Simoes, S. (2015). Oral films: Current status and future perspectives: I - Galenical development and quality attributes. *J Control Release*, 206, p.1-19
- Bujacz, A., Turek, M., Majzner, W. et Lodyga-Chruscinska, E. (2010). X-ray structure of a novel histidine-copper(II) complex. *Russ. J. Coord. Chem*, 36, p.430-435
- Bukharov, M. S., Shtyrlin, V. G., Mukhtarov, ASh, Mamin, G. V., Stapf, S., Mattea, C., Serov, N. Y. (2014). Study of structural and dynamic characteristics of copper(II) amino acid complexes in solutions by combined EPR and NMR relaxation methods. *Phys Chem Chem Phys*, 16, p.9411-9421
- Burg, M. B., Ferraris, J. D. et Dmitrieva, N. I. (2007). Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev*, 87, p.1441-1474
- Cadenas, E. et Packer, L. (1996). *Handbook of antioxidants*. New York, Marcel Dekker.732 pages
- Caillet, S., Côté, J., Doyon, G., Sylvain, J. F. et Lacroix, M. (2011). Antioxidant and antiradical properties of cranberry juice and extracts. *Food Res. Int*, 44, p.1408-1413
- Carocho, M. et Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol*, 51, p.15-25

- Cascone, M. G., Maltinti, S., Barbani, N. et Laus, M. (1999). Effect of chitosan and dextran on the properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels. *J Mater Sci Mater Med*, 10, p.431-435
- Casettari, L, Vllasaliu, D, Castagnino, E, Stolnik, S, Howdle, S et Illum, L. (2012). PEGylated chitosan derivatives: Synthesis, characterizations and pharmaceutical applications. *Prog Polym Sci*, 37, p.659-685
- Chan, Lai Wah, Hao, Jin Song et Heng, Paul Wan Sia. (1999). Evaluation of Permeability and Mechanical Properties of Composite Polyvinyl Alcohol Films. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 47, p.1412-1416
- Chang, Y., Hsu, C. K., Wei, H. J., Chen, S. C., Liang, H. C., Lai, P. H. et Sung, H. W. (2005). Cell-free xenogenic vascular grafts fixed with glutaraldehyde or genipin: in vitro and in vivo studies. *J Biotechnol*, 120, p.207-219
- Chaouat, Marc, Le Visage, Catherine, Baille, Wilms E., Escoubet, Brigitte, Chaubet, Frédéric, Mateescu, Mircea Alexandru et Letourneur, Didier. (2008). A Novel Cross-linked Poly(vinyl alcohol) (PVA) for Vascular Grafts. *Adv Funct Mater*, 18, p.2855-2861
- Chen, CT, Chang, YJ, Chen, MC et Tobolsky, AV. (1973). Formalised poly(vinyl alcohol) membranes for reverse osmosis. *J Appl Polym Sci*, 17, p.789-796
- Chiellini, E., Corti, A. et Solaro, R. . (1999). Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based blown films under different environmental conditions. *Polym Degrad Stab*, 64, p.305-312

- Chiellini, Emo, Corti, Andrea, D'Antone, Salvatore et Solaro, Roberto. (2003). Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials. *Prog Polym Sci*, 28, p.963-1014
- Cho, J. D., Lyoo, W. S., Chvalun, S. N. et Blackwell, J. (1999). X-ray Analysis and Molecular Modeling of Poly(vinyl alcohol)s with Different Stereoregularities. *Macromolecules*, 32, p.6236-6241
- Cho, Young In, No, Hong Kyoon et Meyers, Samuel P. (1998). Physicochemical Characteristics and Functional Properties of Various Commercial Chitin and Chitosan Products. *J Agr Food Chem*, 46, p.3839-3843
- Christopherson, G. T., Song, H. et Mao, H. Q. (2009). The influence of fiber diameter of electrospun substrates on neural stem cell differentiation and proliferation. *Biomaterials*, 30, p.556-564
- Chuang, W.-Y. , Young, T.-H. , Yao, C.-H. et Chiu, W.-Y. . (1999). Properties of the poly(vinyl alcohol)/chitosan blend and its effect on the culture of fibroblast in vitro. *Biomaterials*, 20, p.1479-1487
- Cohen, G. et Hochstein, P. (1963). Glutation peroxidase: the primery agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry*, 2, p.1420-1428
- Colson, Y. L. et Grinstaff, M. W. (2012). Biologically Responsive Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *Adv Mater*, 24, p.3878-3886
- Corradi, A. B. (1992). Structures and stabilities of metal(II) (Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Pd(II), Cd(II)) compounds of N-protected amino acids. *Coord Chem Rev*, 117, p.45-98

- Coyle, P, Philcox, J. C., Carey, L. C. et Rofe, A. M. (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci*, 59, p.627-647
- Crawford, H. (1925). The Use of Urea as a Diuretic in Advanced Heart Failure. *Arch Intern Med*, 36, p.530-541
- Creighton, T. E. (1993). *Proteins: Structures and Molecular Properties*. New York, W. H. Freeman & Co
- Currier, T. A., Bohnert, D. W., Falck, S. J. et Bartle, S. J. (2004). Daily and alternate day supplementation of urea or biuret to ruminants consuming low-quality forage: I. Effects on cow performance and the efficiency of nitrogen use in wethers. *J Anim Sci*, 82, p.1508-1517
- Dalecki, Alex G., Crawford, Cameron L. et Wolschendorf, Frank. (2017). Copper and Antibiotics: Discovery, Modes of Action, and Opportunities for Medicinal Applications. *Adv Microb Physiol*, 70, p.193-260
- Daniel, K.G., Harbach, R.H., Guida, W.C. et Dou, Q.P. (2004). Copper Storage Diseases: Menkes, Wilsons, and Cancer. *Front Biosci*, 9, p.2652-2662
- Daniele, Salvatore et Pena, Maria J. (1993). Cyclic voltammetric investigation of the Cu—histidine system at platinum conventional and microelectrodes. *Electrochimica Acta*, 38, p.165-174
- Danks, D. M., Campbell, P. E., Stevens, B. J., Mayne, V. et Cartwright, E. (1972). Menkes's kinky hair syndrome. An inherited defect in copper absorption with widespread effects. *Pediatrics*, 50, p.188-201

- Darmany, Alexandre P., Gregory, Daniel D., Guo, Yushen, Jenks, William S., Burel, Laure, Eloy, Dominique et Jardon, Pierre. (1998). Quenching of Singlet Oxygen by Oxygen- and Sulfur-Centered Radicals: Evidence for Energy Transfer to Peroxyl Radicals in Solution. *J Am Chem Soc*, 120, p.396-403
- David, S et Patel, B.N. (2000). Ceruloplasmin: Structure and function of an essential ferroxidase. *Adv Str Bio*, 6, p.211-237
- Davis, A. V. et O'Halloran, T. V. (2008). A place for thioether chemistry in cellular copper ion recognition and trafficking. *Nat Chem Biol*, 4, p.148-151
- De La Fuente, M., Ravina, M., Paolicelli, P., Sanchez, A., Seijo, B. et Alonso, M. J. (2010). Chitosan-based nanostructures: a delivery platform for ocular therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*, 62, p.100-117
- De Oliveira Fulgencio, G., Viana, F. A., Silva, R. O., Lobato, F. C., Ribeiro, R. R., Fanca, J. R., . . . da Silva Cunha-Junior, A. (2014). Mucoadhesive chitosan films as a potential ocular delivery system for ofloxacin: preliminary in vitro studies. *Vet Ophthalmol*, 17, p.150-155
- De Souza, C. J. E, Pereira, M. M. et Mansur, H. S. (2009). Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PVA and chemically crosslinked. *J Mater Sci Mater Med*, 20, p.553-561
- Decaux, Guy. (2001). Long-term treatment of patients with inappropriate secretion of antidiuretic hormone by the vasopressin receptor antagonist conivaptan, urea, or furosemide. *Am. J. Med.*, 110, p.582-584

- Deepak, Sharma, Kaur, Daljit, Verma, Shivani, Singh, Davinder, Singh, Mandeep, Singh, Gurmeet et Garg, Rajeev. (2015). Fast Dissolving Oral Films Technology: A Recent Trend For An Innovative Oral Drug Delivery System. *Int J Drug Delivery*, 7, p.60-75
- DeGrado, W. F., Summa, C. M., Pavone, V., Nastri, F. et Lombardi, A. (1999). De novo design and structural characterization of proteins and metalloproteins. *Annu Rev Biochem*, 68, p.779-819
- Deschamps, P., Kulkarni, P. P., Gautam-Basak, M. et Sarkar, B. (2005). The saga of copper(II)-l-histidine. *Coordin. Chem. Rev*, 249, p.895-909
- Deschamps, P., Kulkarni, P. P. et Sarkar, B. (2004). X-ray structure of physiological copper(II)-bis(L-histidinato) complex. *Inorg. Chem.*, 43, p.3338-3340
- Diab, Mostafa Amin, El-Sonbati, Adel Zak, Al-Halawany, Mohamed Mohamed et Bader, Dina Mohamed Diao. (2012). Thermal Stability and Degradation of Chitosan Modified by Cinnamic Acid. *Open Journal of Polymer Chemistry*, 2, p.14-20
- Dimida, Simona, Demitri, Christian, De Benedictis, Vincenzo M., Scalera, Francesca, Gervaso, Francesca et Sannino, Alessandro. (2015). Genipin-cross-linked chitosan-based hydrogels: Reaction kinetics and structure-related characteristics. *J Appl Polym Sci*, 132(28).
- Dolomanov, Oleg V., Bourhis, Luc J., Gildea, Richard J., Howard, Judith A. K. et Puschmann, Horst. (2009). OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program. *J. Appl. Crystallogr*, 42, p.339-341
- Donnan, F. G. (1924). The Theory of Membrane Equilibria. *Chem Rev*, 1, p.73-90

- Ducharme, P., Maltais, D., Desroches, D., Mateescu, M. A. et Paquin, J. (2010). Ceruloplasmin-induced aggregation of P19 neurons involves a serine protease activity and is accompanied by reelin cleavage. *Neuroscience*, 167, p.633-643
- Duchesne, R., Klein, J. D., Velotta, J. B., Doran, J. J., Rouillard, P., Roberts, B. R., . . . Sands, J. M. (2001). UT-A Urea Transporter Protein in Heart: Increased Abundance During Uremia, Hypertension, and Heart Failure. *Circ. Res.*, 89, p.139-145
- Dupont, Christopher L., Butcher, Andrew, Valas, Ruben E., Bourne, Philip E. et Caetano-Anollés, Gustavo. (2010). History of biological metal utilization inferred through phylogenomic analysis of protein structures. *P Natl Acad Sci USA*, 107, p.10567-10572
- Dutta, PK, Tripathi, S et Dutta, J. (2004). Chitin and Chitosan: chemistry, properties and applications. *J Sci Ind Res*, 3, p.20-31
- Ebdon, J. R. (1997). Synthetic polymers. Technology, properties, applications. *Polym Int*, 42, p.127-127
- Ebel, M. et Rehder, D. (2006). Interaction of vanadyl (VO<sub>2</sub><sup>+</sup>) with ligands containing serine, tyrosine, and threonine. *Inorg Chem*, 45, p.7083-7090
- El Khoury, Y. et Hellwig, P. (2009). Infrared spectroscopic characterization of copper-polyhistidine from 1,800 to 50 cm<sup>-1</sup>): model systems for copper coordination. *J. Biol. Inorg. Chem*, 14, p.23-34

- Elzoghby, Ahmed. (2013). Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research. *J Control Release*, 172, p.1075-1091
- Ershov, B. G., Sukhov, N. L., Nudga, L. A., Baklagina, Y. G., Kozhevnikova, L. G. et Petropavlovskii, G. A. (1993). Radiation Destruction of Chitin. *Russ J App Chem*, 66, p.540-545
- Esmaeili, Ladan, Perez, Mariela Gomez, Jafari, Maziar, Paquin, Joanne, Ispas-Szabo, Pompilia, Pop, Veronica, Mateescu, Mircea Alexandru. (2019). Copper complexes for biomedical applications: Structural insights, antioxidant activity and neuron compatibility. *J. Inorg. Biochem.*, 192, p.87-97
- Evertsson, B. (1969). The crystal structure of bis-L-histidinecopper(II) dinitrate dihydrate. *Acta Crystallogr B*, 25, p.30-41
- Fan, L., Yang, H., Yang, J., Peng, M. et Hu, J. (2016). Preparation and characterization of chitosan/gelatin/PVA hydrogel for wound dressings. *Carbohydr Polym*, 146, p.427-434
- Felt, O, Buri, P et Gurny, R. (1998). Chitosan: a unique polysaccharide for drugdelivery. *Drug Dev Ind Pharm*, 24, p.979-993
- Feriden, E. (1976). Copper and iron metaloproteins. *Trends Biochem Sci*, 1, p.273-274
- Festa, R. A. et Thiele, D. J. (2011). Copper: an essential metal in biology. *Curr Biol*, 21, p.R877-883

- Figueiredo, K. C. S., Alves, T. L. M. et Borges, C. P. (2009). Poly(vinyl alcohol) films crosslinked by glutaraldehyde under mild conditions. *J Appl Polym Sci*, 111, p.3074-3080
- Finar, I. L. (1973). *Organic Chemistry*. London, Longman Group Limited. 460 pages.
- Finch, CA. (1992). *Polyvinyl alcohol-Developments*. United Kingdom, John Wiley & Sons Ltd
- Flemming, C. A. et Trevors, J. T. (1989). Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water. Air. Soil. Poll.*, 44, p.143-158
- Fraga, C. G. (2005). Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Mol Aspects Med*, 26, p.235-244
- Freeman, H. C., Smith, J. E. W. L. et Taylor, J. C. (1959). Crystallographic Studies of the Biuret Reaction. *Nature*, 184, p.707-710
- Freisinger, P., Horvath, R., Macmillan, C., Peters, J. et Jaksch, M. (2004). Reversion of hypertrophic cardiomyopathy in a patient with deficiency of the mitochondrial copper binding protein Sco2: is there a potential effect of copper? *J. Inherit. Metab. Dis*, 27, p.67-79
- Frieden, E. et Hsieh, H. S. (1976). Ceruloplasmin: the copper transport protein with essential oxidase activity. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 44, p.187-236
- Fukai, T. et Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*, 15, p.1583-1606

- Fukamizo, T., Ohkawa, T., Ikeda, Y. et Goto, S. (1994). Specificity of chitosanase from *Bacillus pumilus*. *Biochim Biophys Acta*, 1205, p.183-188
- Fumio, Urushizaki, Hiroshi, Yamaguchi, Kumiko, Nakamura, Sachihiko, Numajiri, Kenji, Sugibayashi et Yasunori, Morimoto. (1990). Swelling and mechanical properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels. *Int J Pharm*, 58, p.135-142
- Gaaz, T. S., Sulong, A. B., Akhtar, M. N., Kadhum, A. A., Mohamad, A. B. et Al-Amiery, A. A. (2015). Properties and Applications of Polyvinyl Alcohol, Halloysite Nanotubes and Their Nanocomposites. *Molecules*, 20, p.22833-22847
- Gala, L., Lawson, M., Jomova, K., Zelenicky, L., Congradyova, A., Mazur, M. et Valko, M. (2014). EPR spectroscopy of a clinically active (1:2) copper(II)-histidine complex used in the treatment of Menkes disease: a Fourier transform analysis of a fluid CW-EPR spectrum. *Molecules*, 19, p.980-991
- Galaev, IY et Mattiason, B. (1999). Smart polymers and what they do in biotechnology and medicine. *Trends Biotechnol*, 17, p.335-340
- Gamble, Patricia E. et Burke, John J. (1984). Effect of Water Stress on the Chloroplast Antioxidant System. *Plant Physiol*, 76, p.615-621
- Gangopadhyay, D., Singh, S. K., Sharma, P., Mishra, H., Unnikrishnan, V. K., Singh, B. et Singh, R. K. (2016). Spectroscopic and structural study of the newly synthesized heteroligand complex of copper with creatinine and urea. *Spectrochim Acta A-M*, 154, p.200-206

- George, S., Chellapandian, M., Sivasankar, B. et Jayaraman, K. (1997). A new process for the treatment of fertilizer effluent using immobilized urease. *Bioprocess Eng*, 16, p.83-85
- Gil, E.S. et Hudson, S.M. (2004). Stimuli-Responsive Polymers and Their Bioconjugates. *Prog Polym Sci*, 29, p.1173-1222
- Giovanelli, John, Mudd, S. Harvey et Datko, Anne H. (1980). Sulfur Amino Acids in Plants. Dans Miflin, B. J. (dir.), *Amino Acids and Derivatives* : Academic Press, p. 453-505.
- Glorieux, C. et Calderon, P. B. (2017). Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem*, 398, p.1095-1108
- Gnewuch, C. Thomas et Sosnovsky, George. (1997). A Critical Appraisal of the Evolution of N-Nitrosoureas as Anticancer Drugs. *Chem Rev*, 97, p.829-1014
- Gokhale, N. H., Padhye, S. B., Billington, D. C., Rathbone, D. L., Croft, S. L., Kendrick H. D., Powell, A. K. (2003). Synthesis and characterization of copper(II) complexes of pyridine-2-carboxamidrazones as potent antimalarial agents. *Inorg Chim Acta*, 349, p.23-29
- Gomez Perez, M., Fourcade, L., Mateescu, M. A. et Paquin, J. (2017). Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds. *Anal. Biochem*, 535, p.43-46
- Goodman, B. E. (2002). Transport of small molecules across cell membranes: water channels and urea transporters. *Adv Physiol Educ*, 26, p.146-157

- Gordon, Melissa J. (1999). *Controlling the Mechanical Properties of PVA Hydrogels for Biomedical Applications*. University of Western Ontario, London, Ontario. Master.
- Grass, G., Rensing, C. et Solioz, M. (2011). Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl Environ Microbiol*, 77, p.1541-1547
- Gratzer, PF, Pereira, CA et Lee, JM. (1996). Solvent environment modulates effects of glutaraldehyde crosslinking on tissue-derived biomaterials. *J Biomed Mater Res* 31, p.533-543
- Guidi, I., Galimberti, D., Lonati, S., Novembrino, C., Bamonti, F., Tiriticco, M., Scarpini, E. (2006). Oxidative imbalance in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 27, p.262-269
- Guirguis, O. W. et Moselhey, M. T. H. (2012). Thermal and structural studies of poly(vinyl alcohol) and hydroxypropyl cellulose blends. *Nat Sci*, 4, p.57-67
- Gunasekaran, Sundaram, Wang, Tao et Chai, Chunxiang. (2006). Swelling of pH-sensitive chitosan-poly(vinyl alcohol) hydrogels. *J App Polym Sci*, 102, p.4665-4671
- Gupta, A. et Lutsenko, S. (2009). Human copper transporters: mechanism, role in human diseases and therapeutic potential. *Future Med Chem*, 1, p.1125-1142
- Haber, F. et Weiss, J. (1934). The catalytic decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by iron salts. *Proc Roy Soc London A*, 147, p.332-351

- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, 35, p.1147-1150
- Halliwell, B. . (1995). Antioxidant characterization: methodology and mechanism. *Biochem pharmacol*, 49, p.1341-1348
- Halliwell, B. et Gutteridge, JM. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, 186, p.1-85
- Halpner, Andrew, Handelman, Garry, Harris, Jason, Belmont, Cheryl et Blumberg, Jeffrey. (1998). Protection by Vitamin C of Loss of Vitamin E in Cultured Rat Hepatocytes. *Arch Biochem Biophys*, 359, p.305-309
- Hamidi, M., Azadi, A. et Rafiei, P. (2008). Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 60, p.1638-1649
- Hao, J. et Heng, P. W. (2003). Buccal delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm*, 29, p.821-832
- Harris, Z. L. et Gitlin, J. D. (1996). Genetic and molecular basis for copper toxicity. *Am J Clin Nutr*, 63, p.836S-841S
- Harrison, M.D. , Jones, C.E., Solioz, M. et Dameron, C.T. (2000). Intracellular Copper Routing: The Role of Copper Chaperones. *Trends Biochem Sci*, 25, p.29-32
- He, P, Davis, S.S et Illum, L. (1998). In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Int J Pharm*, 166, p.75-88

- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. et Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*, 13, p.572-584
- Helary, C. et Desimone, M. (2015). Recent Advances in Biomaterials for Tissue Engineering and Controlled Drug Delivery. *Curr pharm biotechno*, 16, p.635-645
- Hennink, WE et van Nostrum, CF. (2002). Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev*, 54, p.13-36
- Henriksen, Ingrid, Green, Keith L., Smart, John D., Smistad, Gro et Karlsen, Jan. (1996). Bioadhesion of hydrated chitosans: An in vitro and in vivo study. *Int J Pharm*, 145, p.231-240
- Herlinger, Albert W., Wenhold, Sandra L. et Long, Thomas Veach. (1970). Infrared spectra of amino acids and their metal complexes. II. Geometrical isomerism in bis(amino acidato)copper(II) complexes. *J. Am. Chem. Soc*, 92, p.6474-6481
- Hermans, K., Van den Plas, D., Kerimova, S., Carleer, R., Adriaensens, P., Weyenberg, W. et Ludwig, A. (2014). Development and characterization of mucoadhesive chitosan films for ophthalmic delivery of cyclosporine A. *Int J Pharm*, 472, p.10-19
- Hester, JF, Olugebefola, SC et Mayes, AM. . (2002). Preparation of pH-responsive polymer membranes by self organization. *Membrane Sci J*, 208, p.375-388
- Hoffmann, AS et Stayton, PS. . (2004). Bioconjugates of smart polymers and proteins: synthesis and application. *Pharmaceut Sci J*, 207, p.139-152

- Holzapfel, B. M., Reichert, J. C., Schantz, J. T., Gbureck, U., Rackwitz, L., Noth, U., . . . Hutmacher, D. W. (2013). How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Adv Drug Deliv Rev*, 65, p.581-603
- Hoyau, S. et Ohanessian, G. (1997). Absolute Affinities of  $\alpha$ -Amino Acids for Cu<sup>+</sup> in the Gas Phase. A Theoretical Study. *J Am Chem Soc*, 119, p.2016-2024
- Huang, D., Ou, B. et Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*, 53, p.1841-1856
- Huang, W., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Ma, X., Zhu, P. et Zhang, Y. (2018). Design, synthesis, and evaluation of genipin derivatives for the treatment of Alzheimer's Disease. *Chem Biol Drug Des*, p.1-13.
- Hubin, T. J., Amoyaw, P. N., Roewe, K. D., Simpson, N. C., Maples, R. D., Carder Freeman, T. N., . . . Khan, M. O. (2014). Synthesis and antimalarial activity of metal complexes of cross-bridged tetraazamacrocyclic ligands. *Bioorg Med Chem*, 22, p.3239-3244
- Hwang, Ma-Ro, Kim, Jong, Lee, jeong hoon, Il Kim, Yong, Kim, Jeong Hoon, Woo Chang, Sun, . . . Choi, Han-Gon. (2010). Gentamicin-Loaded Wound Dressing With Polyvinyl Alcohol/Dextran Hydrogel: Gel Characterization and In Vivo Healing Evaluation. *AAPS PharmSciTech*, 11, p.1092-1103
- Hyon, S.H., Cha, W.I., Ikada, Y., Kita, M., Ogura, Y. et Honda, Y. (1994). Poly(vinyl alcohol) hydrogels as soft contact lens material. *J Biomater Sci Polym*, 5, p.397-406

- Iakovidis, I., Delimaris, I. et Piperakis, S. M. (2011). Copper and its complexes in medicine: a biochemical approach. *Mol Biol Int*, p.1-13.
- Ibrahim, O. B. (2012). Complexes of urea with Mn(II), Fe(III), Co(II), and Cu(II) metal ions. *Adv App Sci Res*, 3, p.3522-3539
- Ighodaro, O. M. et Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med*, 54, p.287-293
- Jackson, Charles V., Mickelson, Judith K., Stringer, Kathleen, Rao, Parinam S. et Lucchesi, Benedict R. (1986). Electrolysis-induced myocardial dysfunction: a novel method for the study of free radical mediated tissue injury. *J Pharmacol Method*, 15, p.305-320
- Jae Suk, Yoo, Yong Jin, Kim, Soo Hwan, Kim et Seung Hwa, Choi. (2011). Study on Genipin: A New Alternative Natural Crosslinking Agent for Fixing Heterograft Tissue. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg*, 44, p.197-207
- Jazvinscak Jembrek, M., Vlainic, J., Radovanovic, V., Erhardt, J. et Orsollic, N. (2014). Effects of copper overload in P19 neurons: impairment of glutathione redox homeostasis and crosstalk between caspase and calpain protease systems in ROS-induced apoptosis. *Biometals*, 27, p.1303-1322
- Jeon, I. S, Ahn, D. S, Park, S. W., Lee, Sungyul et Kim, Bongsoo. (2005). Structures and isomerization of neutral and zwitterion serine-water clusters: Computational study. *Int. J. Quantum Chem*, 101, p.55-66
- Jones, RA. (2004). Biomimetic polymers: Tough and smart. *Nat Mater*, 3, p.209-210

- Jopp, M., Becker, J., Becker, S., Miska, A., Gandin, V., Marzano, C. et Schindler, S. (2017). Anticancer activity of a series of copper(II) complexes with tripodal ligands. *Eur J Med Chem*, 132, p.274-281
- Joseph, J et Nagashri, K. (2012). Novel copper-based therapeutic agent for anti-inflammatory: synthesis, characterization and biochemical activities of copper(II) complexes of hydroxyflavone schiff bases. *Appl Biochem Biotechnol*, 167, p.1446-1458
- Jóźwiak, Tomasz, Filipkowska, Urszula, Szymczyk, Paula, Rodziewicz, Joanna et Mielcarek, Artur. (2017). Effect of ionic and covalent crosslinking agents on properties of chitosan beads and sorption effectiveness of Reactive Black 5 dye. *React Funct Polym*, 114, p.58-74
- Juliano, C., Cossu, M., Pigozzi, P., Rassa, G. et Giunchedi, P. (2008). Preparation, in vitro characterization and preliminary in vivo evaluation of buccal polymeric films containing chlorhexidine. *AAPS PharmSciTech*, 9, p.1153-1158
- Kaler, S. G. (2013). Inborn errors of copper metabolism. *Handb Clin Neurol*, 113, p.1745-1754
- Kaler, S.G. (1998). Metabolic and Molecular Bases of Menkes Disease and Occipital Horn Syndrome. *Pediatr Devel Pathol*, 1, p.85-98
- Kamoun, A., Chen, X., Eldin, M. S. M. et Kenawy, E. R. S. (2015). Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers. *Arab J Chem*, 8, p.1-14

- Kancheva, Vessela D. (2009). Phenolic antioxidants – radical-scavenging and chain-breaking activity: A comparative study. *Eur J Lipid Sci Technol*, 111, p.1072-1089
- Karki, Sandeep, Kim, Hyeongmin, Na, Seon-Jeong, Shin, Dohyun, Jo, Kanghee et Lee, Jaehwi. (2016). Thin films as an emerging platform for drug delivery. *Asian J Pharm Sci*, 11, p.559-574
- Kashyap, N., Kumar, N. et Kumar, M. N. V. R. (2005). Hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 22, p.107-149
- Kenawy, E. R., Kamoun, E. A., Eldin, M. S. et El-Meligy, M. A. (2014). Physically crosslinked poly(vinyl alcohol)-hydroxyethyl starch blend hydrogel membranes: synthesis and characterization for biomedical applications. *Arab J Chem*, 7, p.372-380
- Kerksick, C. et Willoughby, D. (2005). The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *J Int Soc Sports Nutr*, 2, p.38-44
- Kim, B.E., Smith, K. et Petris, M.J. (2003). A Copper Treatable Menkes Disease Mutation Associated with Defective Trafficking of a Functional Menkes Copper ATPase. *J Med Genet*, 40, p.290-295
- Kim, I. Y., Seo, S. J., Moon, H. S., Yoo, M. K., Park, I. Y., Kim, B. C. et Cho, C. S. (2008). Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnol Adv*, 26, p.1-21
- Kim, Y. K., Frazier, A. W. et Griffin, C. L. (1989). Solubility in system CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O *Fert Res*, 20, p.115-121

- Klevay, L. M. (2008). Alzheimer's disease as copper deficiency. *Med Hypotheses*, 70, p.802-807
- Kochergina, L. A. et Drobilova, O. M. (2009). The Thermochemical Characteristics of Complex Formation Reactions between 3d Transition Metal Ions and L-Serine in Aqueous Solution. *Russ J Phys Ch*, 83, p.1842-1849
- Kodama, H., Fujisawa, C. et Bhadhprasit, W. (2012). Inherited Copper Transport Disorders: Biochemical Mechanisms, Diagnosis, and Treatment. *Curr Drug Metab*, 13, p.237-250
- Kohen, R., Yamamoto, Y., Cundy, K. C. et Ames, B. N. (1988). Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 85, p.3175-3179
- Konan, K. V., Le Tien, C. et Mateescu, M. A. (2016). Electrolysis-induced fast activation of the ABTS reagent for an antioxidant capacity assay. *Anal. Methods-UK*, 8, p.5638-5644
- Koppolu, B. P., Smith, S. G., Ravindranathan, S., Jayanthi, S., Suresh Kumar, T. K. et Zaharoff, D. A. (2014). Controlling chitosan-based encapsulation for protein and vaccine delivery. *Biomaterials*, 35, p.4382-4389
- Krayukhina, M. A., Samoilova, N. A. et Yamskov, I. A. (2008). Polyelectrolyte complexes of chitosan: formation, properties and applications. *Russ Chem Rev*, 77, p.799-813

- Kumar, N. et Low, P. A. (2004). Myeloneuropathy and anemia due to copper malabsorption. *J Neurol*, 251, p.747-749
- Kweon, Dong-Keon, Song, Seok-Beom et Park, Yong-Yook. (2003). Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator. *Biomaterials*, 24, p.1595-1601
- Lambert, Joseph B., Shurvell, Herbert F., Lightner, David A. et Cooks, R. Graham. (1998). *Organic Structural Spectroscopy*. Pearson. 568 pages
- Larraneta, E., Stewart, S., Ervine, M., Al-Kasasbeh, R. et Donnelly, R. F. (2018). Hydrogels for Hydrophobic Drug Delivery. Classification, Synthesis and Applications. *J Funct Biomater*, Article Électronique. 9, ID: E13, DOI: 10.3390/jfb9010013.
- Laurie, S. H. (1995). *Handbook of Metal–Ligand Interactions in Biological Fluids: Bioinorganic Chemistry*. Vol. 1 New-York, 321 pages
- Lee, K. Y. et Mooney, D. J. (2001). Hydrogels for Tissue Engineering. *Chem Rev*, 101, p.1869-1880
- Lee, K. Y., Alsberg, E. et Mooney, D. J. (2001). Degradable and injectable poly (aldehydeguluronate) hydrogels for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res Part A*, 56, p.228-233
- Lee, Y.M. , Kimt, S.H. et Kimt, S.J. . (1996). Preparation and characteristics of  $\beta$ -chitin and poly(vinyl alcohol) blend. *Polymer*, 37, p.5897-5905

- Levi, Steva, Rac, Vladislav, Manojlovi, Verica, Raki, Vesna, Bugarski, Branko, Flock, Teresa, . . . Nedovi, Viktor. (2011). Limonene encapsulation in alginate/poly (vinyl alcohol). *Proc Food Sci*, 1, p.1816-1820
- Li, W., Zhou, J. et Xu, Y. (2015). Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomed Rep*, 3, p.617-620
- Liang, N. et Kitts, D. D. (2014). Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules*, 19, p.19180-19208
- Liu, J., Chakraborty, S., Hosseinzadeh, P., Yu, Y., Tian, S., Petrik, I., . . . Lu, Y. (2014). Metalloproteins containing cytochrome, iron-sulfur, or copper redox centers. *Chem Rev*, 114, p.4366-4469
- Liu, Quan, Zuo, Qinhu, Guo, Rui, Hong, An, Li, Chenghua, Zhang, Yi, . . . Xue, Wei. (2015). Fabrication and characterization of carboxymethyl chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogels containing alginate microspheres for protein delivery. *J Bioact Compat Pol*, 30, p.397-411
- Lozinsky, VI et Plieva, FM. (1998). Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments. *Enzyme Microb Tech*, 23, p.227-242
- Lu, Shelly C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochim biophys acta*, 1830, p.3143-3153
- Lu, Y, Berry, SM et Pfister, TD. (2001). Engineering novel metalloproteins: design of metal-binding sites into native protein scaffolds. *Chem Rev*, 101, p.3047-3080

- Lu, Y. (2005). Design and engineering of metalloproteins containing unnatural amino acids or non-native metal-containing cofactors. *Curr Opin Chem Biol*, 9, p.118-126
- Lukash, AI, Kartashev, IP et Antipina, TV. (1980). Participation of iron ions in antioxidant action of urea. *Ukr Biokhim Zh*, 52, p.462-465
- Mader, E. A., Davidson, E. R. et Mayer, J. M. (2007). Large ground-state entropy changes for hydrogen atom transfer reactions of iron complexes. *J Am Chem Soc*, 129, p.5153-5166
- Maliaritsi, E. , Zoumpoulakis, L., Simitzis, J., Vassiliou, P. et Hristoforoua, E. (2006). Coagulation sensors based on magnetostrictive delay lines for biomedical and chemical engineering applications. *J magn magn mater*, 299, p.41-52
- Maltais, D., Desroches, D., Aouffen, M., Mateescu, M. A., Wang, R. et Paquin, J. (2003). The blue copper ceruloplasmin induces aggregation of newly differentiated neurons: a potential modulator of nervous system organization. *Neuroscience*, 121, p.73-82
- Mandal, S., Das, G. et Askari, H. (2014). Experimental and quantum chemical modeling studies of the interactions of L-phenylalanine with divalent transition metal cations. *J. Chem. Inf. Model*, 54, p.2524-2535
- Mandal, Shilpi, Das, Gunajyoti et Askari, Hassan. (2015). A combined experimental and quantum mechanical investigation on some selected metal complexes of l-serine with first row transition metal cations. *J. Mol. Struct*, 1081, p.281-292
- Mansur, Herman S., Sadahira, Carolina M., Souza, Adriana N. et Mansur, Alexandra A. P. (2008). FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol)

hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Adv Mater Res-Switz*, 28, p.539-548

Marinova, G. et Batchvarov, V. (2011). Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulg J Agric Sci*, 17, p.11-24

Marzano, C., Pellei, M., Tisato, F. et Santini, C. (2009). Copper Complexes as Anticancer Agents. *Anticancer Agents Med Chem*, 9, p.185-211

Mateescu, M. A, Lenaerts, V. et Dumoulin, Y. (1994). *Cross-linked material for controlled release of biologically active compounds*. Canada 2,041,774

Mathew, Jainamma et Kodama, Makoto. (1992). Study of Blood Compatible Polymers. I. Modification of Poly(vinyl alcohol). *Polym J*, 24, p.31-41

Mathews, D. T., Birney, Y. A., Cahill, P. A. et McGuinness, G. B. (2008). Vascular cell viability on polyvinyl alcohol hydrogels modified with water-soluble and -insoluble chitosan. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 84, p.531-540

Matthew, H. W. T. . (2002). Chitosan as a molecular scaffold for biomimetic design of glycopolymer biomaterials. Dans Dillow, A. K. et Lowman, A. M. (dir.), *Biomimetic materials and design: biointerfacial strategies, tissue engineering, and targeted drug delivery*. New York : Marcel Dekker, Inc, p. 260-280

McCoy, Benjamin J. et Madras, Giridhar. (1997). Degradation kinetics of polymers in solution: Dynamics of molecular weight distributions. *AIChE Journal*, 43, p.802-810

- Menkes, J.H. (1999). Menkes Disease and Wilson Disease: Two Sides of the Same Copper Coin. Part II: Wilson Disease. *Eur J Paediatr Neuro*, 3, p.245-253
- Mi, F.-L., Sung, H.-W. et Shyu, S.-S. (2001). Release of indomethacin from a novel chitosan microsphere prepared by a naturally occurring crosslinker: Examination of crosslinking and polycation-anionic drug interaction. *J Appl Polym Sci*, 81, p.1700-1711
- Mi, F.-L., Sung, Hsing-Wen et Shyu, Shin-Shing. (2002). Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. *Carbohydr Polym*, 48, p.61-72
- Mi, F. L., Huang, C. T., Liang, H. F., Chen, M. C., Chiu, Y. L., Chen, C. H. et Sung, H. W. (2006). Physicochemical, antimicrobial, and cytotoxic characteristics of a chitosan film cross-linked by a naturally occurring cross-linking agent, aglycone geniposidic acid. *J Agric Food Chem*, 54, p.3290-3296
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V. et Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)*, 84, p.407-412
- Millon, L. E., Mohammadi, H. et Wan, W. K. (2006). Anisotropic polyvinyl alcohol hydrogel for cardiovascular applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 79, p.305-311
- Min, D. B. et Boff, J. M. (2006). Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. *Compr Rev Food Sci F*, 1, p.58-72

- Mishra, Krishnanand, Ojha, Himanshu et Chaudhury, Nabo Kumar. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chem*, 130, p.1036-1043
- Mitchell, R. N. et Schoen, F. J. (2013). Tissues, the extracellular matrix, and cell-biomaterials interactions. Dans Lemons, J., Ratner, B., Hoffman, A. et Schoen, F. (dir.), *Biomaterials science an introduction to materials in medicine*. Amsterdam : Elsevier Ltd. p. 529-558
- Moore, H. E., Garmendia, M. J. et Cooper, W. J. (1984). Kinetics of monochloramine oxidation of N,N-diethyl-p-phenylenediamine. *Environ. Sci. Technol.*, 18, p.348-353
- Muggli, D.S., Burkoth, A.K. et Anseth, K.S. (1999). Crosslinked polyanhydrides for use in orthopedic applications: degradation behavior and mechanics. *J Biomed Mater Res*, 46, p.271-278
- Muzzarelli, R. A. (2010). Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers. *Mar Drugs*, 8, p.292-312
- Muzzarelli, Riccardo A. A. (2009). Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydr Polym*, 77, p.1-9
- Muzzarelli, Riccardo A. A., Lough, Catherine et Emanuelli, Monica. (1987). The molecular weight of chitosans studied by laser light-scattering. *Carbohydr Res*, 164, p.433-442
- Nagasaki, Y, Luol, L, Tsuruta, T et Kataoka, K. (2001). Novel pH-sensitive poly(silamine) hydrogel microsphere processing a stable skin layer. *Macromol Rapid Comm*, 22, p.1124-1127

- Naumov, D. Y. , Yufit, D. S. , Boldyreva, E. V. et Howard, J. A. . (2001). A urea complex of copper (II) hypophosphite at 293, 100 and 15 K. *Acta Crystal*, 57, p.790-792
- Naveen Kumar, H. M. P., Prabhakar, M. N., Venkata Prasad, C., Madhusudhan Rao, K., Ashok Kumar Reddy, T. V., Chowdoji Rao, K. et Subha, M. C. S. (2010). Compatibility studies of chitosan/PVA blend in 2% aqueous acetic acid solution at 30°C. *Carbohyd Polym*, 82, p.251-255
- Nesseem, D. I., Eid, S. F. et El-Houseny, S. S. (2011). Development of novel transdermal self-adhesive films for tenoxicam, an anti-inflammatory drug. *Life Sci*, 89, p.430-438
- Niaounakis, M. (2014). Introduction. Dans Niaounakis, M. (dir.), *Biopolymers: Processing and Products* p. 1-75.
- Niki, E. et Noguchi, N. (2000). Evaluation of antioxidant capacity. What capacity is being measured by which method? *IUBMB Life*, 50, p.323-329
- Nikkhah, G., Tonn, J. C., Hoffmann, O., Kraemer, H. P., Darling, J. L., Schonmayr, R. et Schachenmayr, W. (1992). The MTT assay for chemosensitivity testing of human tumors of the central nervous system. Part I: Evaluation of test-specific variables. *J Neurooncol*, 13, p.1-11
- Noctor, G. et Foyer, C.H. . (1998). Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen under Control. *Annu Rev Plant Phys*, 49, p.249-279
- O'Dell, B. L. (1976). Biochemistry of Copper. *Med Clin N Am*, 60, p.687-703

- Oberley-Deegan, R. E., Regan, E. A., Kinnula, V. L. et Crapo, J. D. (2009). Extracellular superoxide dismutase and risk of COPD. *Novart Fdn Symp*, 6, p.307-312
- Omidian, H et Park, K. (2010). Introduction to hydrogels. Dans Ottenbrite, R., Park, K. et Okano, T. (dir.), *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*: Springer. p.1-15
- Paiva, S. A. et Russell, R. M. (1999). Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *J Am Coll Nutr*, 18, p.426-433
- Pal, K., Banthia, A. K. et Majumdar, D. K. (2007). Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-gelatin hydrogel membranes for biomedical applications. *AAPS PharmSciTech*, 8, p.1-5
- Pal, Kunal, Paulson, Allan T. et Rousseau, Dérick. (2009). Biopolymers in Controlled-Release Delivery Systems. Dans Kasapis, S., Norton, I. et Ubbink, J. (dir.), *Modern Biopolymer Science*: Academic Press. p. 519-557
- Parida, P., Behera, A. et Mishra, S. C. (2012). Classification of Biomaterials used in Medicine. *Int J Adv App Sci*, 1, p.125-129
- Park, J. S., Park, J. W. et Ruckenstein, E. (2001). Thermal and dynamic mechanical analysis of PVA/MC blend hydrogels. *Polymer*, 42, p.4271-4280
- Park, SY et Bae, YH. (1999). Novel pH sensitive polymerscontaining sulfonamide groups. *Macromol Rapid Comm*, 20, p.269-273

- Patel, V. F., Liu, F. et Brown, M. B. (2011). Advances in oral transmucosal drug delivery. *J Control Release*, 153, p.106-116
- Pecul, Magdalena. (2006). Theoretical simulation of the ROA spectra of neutral cysteine and serine. *Chem. Phys. Lett*, 427, p.166-176
- Pehlivan, Fadime Eryılmaz (2017). Vitamin C: An Antioxidant Agent. Dans Hamza, A. (dir.), *Vitamin C* : IntechOpen doi: 10.5772/intechopen, p. 23-35
- Pena, M. M., Lee, J. et Thiele, D. J. (1999). A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr*, 129, p.1251-1260
- Peniche, Carlos, Argüelles-Monal, Waldo, Davidenko, Natalia, Sastre, Roberto, Gallardo, Alberto et San Román, Julio. (1999). Self-curing membranes of chitosan/PAA IPNs obtained by radical polymerization: preparation, characterization and interpolymer complexation. *Biomaterials*, 20, p.1869-1878
- Peppas, N. A. et Merrill, E. W. (1977). Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels as swollen elastic networks. *J Appl Polym Sci*, 21, p.1763-1770
- Pisoschi, A. M. et Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*, 97, p.55-74
- Pokorný, Jan. (2007). Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? *Eur J Lipid Sci Technol*, 109, p.629-642

- Pop, V., Kriza, A. et Ilis, M. (2002). Synthesis and stability studies in physiological-like conditions of two urea complexes of copper (II) and manganese (II). *Anal. Univ. Bucuresti.*, *XI*, p.63-68
- Popovici, C. , Saykova, I. et Tylkowski, B. . (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Rev. Génie. Ind*, *4*, p.25-39
- Prasnitz, M. R., Mitragotri, S. et Langer, R. (2004). Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*, *3*, p.115-124
- Prenci, E. et Berto, S. (2002). Interaction of copper(II) with imidazole pyridine nitrogen-containing ligands in aqueous medium: a spectroscopic study. *J Inorg Biochem*, *88*, p.37-43
- Prior, R. L., Wu, X. et Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*, *53*, p.4290-4302
- Priya James, H., John, R., Alex, A. et Anoop, K. R. (2014). Smart polymers for the controlled delivery of drugs - a concise overview. *Acta Pharm Sin B*, *4*, p.120-127
- Puig, S et Thiele, J. (2002). Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr Opin Chem Biol*, *2*, p.171-180
- Qiu, K. et Netravali, A. N. (2012). Fabrication and characterization of biodegradable composites based on microfibrillated cellulose and polyvinyl alcohol. *Compos Sci Technol*, *72*, p.1588-1594

- Qiujin, Zhu. (2015). Chitosan in Molecularly-Imprinted Polymers: Current and Future Prospects. *Int J Mol Sci*, 16, p.18328-18347
- Rae, T. D.; , Schmidt, P. J.; , Pufahl, R. A.; , Culotta, V. C.; et O'Halloran, T. V. (1999). Undetectable Intracellular Free Copper: The Requirement of a Copper Chaperone for Superoxide Dismutase. *Science*, 284, p.805-808
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging*, 2, p.219-236
- Rajasekaran, A. , Sivakumar, V. et Karthika, K. . (2010). Design and evaluation of polymeric controlled release *Eng Technol*, 6, p.108-115
- Raptis, Stavros, Anastassopoulou, Jane et Theophanides, Theophile. (2000). Vibrational and theoretical studies of urea and magnesium-urea complexes. *Theor Chem Acc*, 105, p.156-164
- Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K. et Kumar, M. N. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release*, 113, p.189-207
- Richardson, J. S., Thomas, K. A., Rubin, B. H. et Richardson, D. C. . (1975). Crystal structure of bovine Cu, Zn superoxide dismutase at 3 Å resolution: chain tracing and metal ligands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72, p.1349-1353
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog Polym Sci*, 31, p.603-632

- Rodrigues, Susana, Dionísio, Marita, López, Carmen Remuñán et Grenha, Ana. (2012). Biocompatibility of chitosan carriers with application in drug delivery. *J Func Biomater*, 3, p.615-641
- Rorabacher, D. B. (2004). Electron transfer by copper centers. *Chem Rev*, 104, p.651-697
- Russo, E., Selmin, F., Baldassari, S., Gennari, C. G. M., Caviglioli, G., Cilirzo, F., . . . Parodi, B. (2016). A focus on mucoadhesive polymers and their application in buccal dosage forms. *J Drug Deliv Sci Tec*, 32, p.113-125
- Saini, M., Singh, Y., Arora, P., Arora, V. et Jain, K. (2015). Implant biomaterials: A comprehensive review. *World J Clin Cases*, 3, p.52-57
- Salman, M. (2012). Infrared spectroscopic investigations on the reaction products resulted from the interaction between silver(i) salts with urea at 90C. *Int J Life Sci Pharma Res*, 2, p.L128-L138
- Samer, M, Streich, D et Meier, W. (2001). pH-sensitive nanocontainers. *Adv Mater*, 13, p.1649-1651
- Santini, C., Pellei, M., Gandin, V., Porchia, M., Tisato, F. et Marzano, C. (2014). Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chem Rev*, 114, p.815-862
- Sarkar, B. (1999). Treatment of Wilson and Menkes Diseases. *Chem Rev*, 99, p.2535-2544
- Sarkar, B. et Wigfield, Y. . (1967). The structure of copper (II) L- histidine chelate. *J Biol Chem*, 23, p.5572-5577

- Sarniak, Agata, Lipińska, Joanna, Tytman, Karol et Lipińska, Stanisława. (2016). Endogenous mechanisms of reactive oxygen species (ROS) generation. *Postępy Hig-Med Dośw (online)*, 70, p.1150-1165
- Sas, K., Robotka, H., Toldi, J et Vecsei, L. (2007). Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J. Neurol. Sci*, 257, p.221-239
- Sashina, E. S., Vnuchkin, A. V. et Novoselov, N. P. (2006). A study of the thermodynamics of chitosan interaction with polyvinyl alcohol and polyethylene oxide by differential scanning calorimetry. *Russ J Appl Chem*, 79, p.1643-1646
- Scheiber, I. F., Mercer, J. F. et Dringen, R. (2014). Metabolism and functions of copper in brain. *Prog. Neurobiol.*, 116, p.33-57
- Sharma, P, Bhale, J, Mishra, A et Malviya, P. (2014). Synthesis and X-ray diffraction study of some nickel(II) complexes of urea and thiourea. *J Phys Conf Ser*, 534, p.1-5
- Sharma, V. S. (1967). The stability constants of metal complexes of serine and threonine. *Biochem Biophys Acta*, 148, p.37-41
- Sharp, P.A. (2003). Ctr1 and Its Role in Body Copper Homeostasis. *Int J Biochem Cell B*, 35, p.288-291
- Sheldrick, G. M. (2008). A short history of SHELX. *Acta. Crystallogr A.*, 64, p.112-122

- Sheldrick, G. M. (2015). SHELXT - integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallogr A*, 71, p.3-8
- Shimazaki, Y., Takani, M. et Yamauchi, O. (2009). Metal complexes of amino acids and amino acid side chain groups. Structures and properties. *Dalton Trans*, p.7854-7869
- Sigel, Helmut et McCormick, Donald B. (1971). Structure of the copper(II)-L-histidine 1:2 complex in solution. *J. Am. Chem. Soc*, 93, p.2041-2044
- Solaro, R., Corti, A. et Chiellini, E. . (2000). Biodegradation of poly (vinyl alcohol) with different molecular weights and degree of hydrolysis. *Polym Adv Technol*, 11, p.873-878
- Somers, P., De Somer, F., Cornelissen, M., Bouchez, S., Gasthuys, F., Narine, K., Van Nooten, G. (2008). Genipin blues: an alternative non-toxic crosslinker for heart valves? *J Heart Valve Dis*, 17, p.682-688
- Sorenson, J. R. J. et Hangarter, W. (1977). Treatment of rheumatoid and degenerative diseases with copper complexes. *Inflammation*, 2, p.217-238
- Soupart, A., Silver, S., Schroöeder, B. , Sterns, R. et Decaux, G. (2002). Rapid (24-Hour) Reaccumulation of Brain Organic Osmolytes (Particularly myo-Inositol) in Azotemic Rats after Correction of Chronic Hyponatremia. *J Am Soc Nephrol*, 13, p.1433-1441
- Spagnol, Cristiane, Rodrigues, Francisco H. A., Pereira, Antonio G. B., Fajardo, André R., Rubira, Adley F. et Muniz, Edvani C. (2012). Superabsorbent hydrogel

composite made of cellulose nanofibrils and chitosan-graft-poly(acrylic acid). *Carbohydr Polym*, 87, p.2038-2045

Spector, R. et Johanson, C. E. (2014). The nexus of vitamin homeostasis and DNA synthesis and modification in mammalian brain. *Mol Brain*, 7, p.1-10

Srinivasa, P. C., Ramesh, M. N., Kumar, K. R. et Tharanathan, R. N. (2003). Properties and sorption studies of chitosan-polyvinyl alcohol blend films. *Carbohydr Polym*, 53, p.431-438

Srivastava, S., Blower, P. J., Aubdool, A. A., Hider, R. C., Mann, G. E. et Siow, R. C. (2016). Cardioprotective effects of Cu(II)ATSM in human vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes mediated by Nrf2 and DJ-1. *Sci Rep*, 6, p.1-13

Stauffer, SR et Peppast, NA. (1992). Poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freezing-thawing cyclic processing. *Polymer*, 33, p.3932-3936

Sudhakar, Y., Kuotsu, K. et Bandyopadhyay, A. K. (2006). Buccal bioadhesive drug delivery--a promising option for orally less efficient drugs. *J Control Release*, 114, p.15-40

Sundberg, R. J. et Martin, R. B. (1974). Interactions of histidine and other imidazole derivatives with transition metal ions in chemical and biological systems. *Chem Rev*, 74, p.471-517

Tabata, Y. (2009). Biomaterial technology for tissue engineering applications. *J R Soc Interface*, 6 Suppl 3, p.S311-324

- Tanigami, Tetsuya, Yano, Keiko, Yamaura, Kazuo et Matsuzawa, Shuji. (1995). Anomalous swelling of poly(vinyl alcohol) film in mixed solvents of dimethylsulfoxide and water. *Polymer*, 36, p.2941-2946
- Tapiero, H, Townsend, DM et Tew, KD. (2003). Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomed Pharmacother*, 57, p.386-398
- Tartara, L. I., Palma, S. D., Allemandi, D., Ahumada, M. I. et Llabot, J. M. (2014). New mucoadhesive polymeric film for ophthalmic administration of acetazolamide. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 8, p.224-232
- Telianidis, J., Hung, Y. H., Materia, S. et Fontaine, S. L. (2013). Role of the P-Type ATPases, ATP7A and ATP7B in brain copper homeostasis. *Front Aging Neurosci*, 5, p.1-17
- Theophanides, T. et Harvey, P. D. (1987). Structural and spectroscopic properties of metal-urea complexes. *Coordin Chem Rev*, 76, p.237-264
- Tisato, F., Marzano, C., Porchia, M., Pellei, M. et Santini, C. (2010). Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies. *Med Res Rev*, 30, p.708-749
- Tripathi, S. ; , Mehrotra, G. K. ; et Dutta, P. K. (2010). Preparation and physicochemical evaluation of chitosan/poly(vinyl alcohol)/pectin ternary film for food-packaging applications. *Carbohydr Polym*, 79, p.711-716
- Umesh, Kumar P., Ashok, Kumar N., Birendra, Kumar B. et Nayak, P. L. . (2011). Synthesis and Characterization of Chitosan-Polyvinyl Alcohol Blended with Cloisite 30B for Controlled Release of the Anticancer Drug Curcumin. *J Biomater Nanobiotech*, 2, p.414-425

- Valensin, G., Basosi, R., Antholine, W. E. et Gaggelli, E. (1985). Structural, motional, and kinetic features of the  $\text{Cu(II)}\square(1\text{-His})_2$  complex in aqueous solution. *J Inorg Biochem*, 23, p.125-130
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. et Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, p.44-84
- van den Berghe, P. V., Folmer, D. E., Malingre, H. E., van Beurden, E., Klomp, A. E., van de Sluis, B., . . . Klomp, L. W. (2007). Human copper transporter 2 is localized in late endosomes and lysosomes and facilitates cellular copper uptake. *Biochem J*, 407, p.49-59
- Vasak, M. (2005). Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elem Med Biol*, 19, p.13-17
- Verwilt, P., Sunwoo, K. et Kim, J. S. (2015). The role of copper ions in pathophysiology and fluorescent sensors for the detection thereof. *Chem Commun (Camb)*, 51, p.5556-5571
- Waggoner, D. J., Bartnikas, T. B. et Gitlin, J. D. (1999). The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiol Dis*, 6, p.221-230
- Wan, W. K., Campbell, G., Zhang, Z. F., Hui, A. J. et Boughner, D. R. (2002). Optimizing the tensile properties of polyvinyl alcohol hydrogel for the construction of a bioprosthetic heart valve stent. *J Biomed Mater Res*, 63, p.854-861

- Wang, Hui, Wang, Mouhua, Zhao, Wenbo, Wei, Wei et Sun, Yuhan. (2010). Reaction of zinc oxide with urea and its role in urea methanolysis. *React Kinet Mech Cat*, 99, p.381-389
- Wang, Mei-Ling, Zhong, Guo-Qing et Chen, Ling. (2016). Synthesis, Optical Characterization, and Thermal Decomposition of Complexes Based on Biuret Ligand. *Int J Optic*, 2, p.1-8
- Wang, X., Wu, L., Aouffen, M., Mateescu, M. A., Nadeau, R. et Wang, R. (1999). Novel cardiac protective effects of urea: from shark to rat. *Br J Pharmacol*, 128, p.1477-1484
- Wang, Y., Bamdad, F., Song, Y. et Chen, L. (2012). Hydrogel particles and other novel protein-based methods for food ingredient and nutraceutical delivery systems. Dans *Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals* : Woodhead Publishing. p.412-450
- Ward, M.A. et Georgiou, T. K. (2011). Thermoresponsive polymers for biomedical applications. *Polymers*, 3, p.1215-1242
- Wening, K. et Breitzkreutz, J. (2011). Oral drug delivery in personalized medicine: unmet needs and novel approaches. *Int J Pharm*, 404, p.1-9
- Wilson, E. W. Jr., Kasperian, M. H. et Martin, R. B. (1970). Binding of copper(II) to potentially tridentate amino acid ligands. *J Am Chem Soc*, 92, p.5365-5372
- Wolosker, H., Dumin, E., Balan, L. et Foltyn, V. N. (2008). D-amino acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration. *FEBS. J*, 275, p.3514-3526

- Wright, James S., Johnson, Erin R. et DiLabio, Gino A. (2001). Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.*, 123, p.1173-1183
- Wulfsberg, Gary. (2002). Introduction aux complexes de métaux de transition : application à la biochimie. Dans Boucekkine, G. et Goubard, F. (dir.), *Chimie inorganique - Modèles théoriques et applications : Cours et exercices corrigés - théories et applications*. Paris : Dunod. p.427-499
- Xie, J., Liu, W. et Schultz, P. G. (2007). A genetically encoded bidentate, metal-binding amino acid. *Angew Chem Int Ed Engl*, 46, p.9239-9242
- Yang, X., Liu, Q., Chen, X., Yu, F. et Zhu, Z. (2008). Investigation of PVA/ws-chitosan hydrogels prepared by combined gama-irradiation and freeze-thawing. *Carbohydr Polym*, 73, p.401-408
- Yogeshkumar, NG, Atul, SG et Adhikrao, VY. (2013). Chitosan and Its Applications: A Review of Literature. *Int J Res in Pharm Biomed Sci*, 4, p.312-332
- Yoshii, F., Zhao, L., Wach, R. A., Nagasawa, N., Mitomo, H. et Kume, T. (2003). Hydrogels of polysaccharide derivatives crosslinked with irradiation at paste-like condition. *Nucl Instr Meth Phys Res B*, 208, p.320-324
- Yoshii, J., Yoshiji, H., Kuriyama, S., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Okuda, H., . . . Fukui, H. (2001). The copper-chelating agent, trientine, suppresses tumor development and angiogenesis in the murine hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer*, 94, p.768-773

- Zhang, K., Qian, Y., Wang, H., Fan, L., Huang, C., Yin, A. et Mo, X. (2010). Genipin-crosslinked silk fibroin/hydroxybutyl chitosan nanofibrous scaffolds for tissue-engineering application. *J Biomed Mater Res A*, 95, p.870-881
- Zhao, L., Mitomo, H., Zhai, M., Yoshii, F., Nagasawa, N. et Kume, T. (2003). Synthesis of antibacterial PVA/CM-chitosan blend hydrogels with electron beam irradiation. *carbohydr polym*, 53, p.439-446
- Zhuang, P. Y., Li, Y. L., Fan, L., Lin, J. et Hu, Q. L. (2012). Modification of chitosan membrane with poly(vinyl alcohol) and biocompatibility evaluation. *Int J Biol Macromol*, 50, p.658-663
- Zou, T. B., He, T. P., Li, H. B., Tang, H. W. et Xia, E. Q. (2016). The Structure-Activity Relationship of the Antioxidant Peptides from Natural Proteins. *Molecules*, 21, p.72-86