

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

CARACTÉRISATION DU SYSTÈME THERMOSENSIBLE CHITOSANE-
GLYCÉROL PHOSPHATE ET APPLICATIONS POUR LA LIVRAISON DE GÈNES

MARC LAVERTU

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

AOÛT 2007



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-35515-2

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-35515-2

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

CARACTÉRISATION DU SYSTÈME THERMOSENSIBLE CHITOSANE-
GLYCÉROL PHOSPHATE ET APPLICATIONS POUR LA LIVRAISON DE GÈNES

présentée par : LAVERTU Marc

en vue de l'obtention du diplôme de Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

Mme HOEMANN Caroline, Ph.D., présidente

M. BUSCHMANN Michael, Ph.D., membre et directeur de recherche

Mme WINNIK Françoise, Ph.D., membre

M. VARUM Kjell Morten, Ph.D., membre

À Jacinthe et Mireille

REMERCIEMENTS

Je veux d'abord remercier mon directeur de recherche Michael Buschmann pour l'encadrement de qualité qu'il m'a offert tout au long de ce projet. Mike, tu sais comment motiver tes troupes en faisant toujours ressortir les aspects positifs de nos travaux de recherche. Avant de te rencontrer dans un cours de physique statistique du programme de génie physique, j'ignorais que je ferais un jour de la recherche dans le domaine des sciences biomédicales. J'ai beaucoup appris avec toi et je suis bien content d'avoir fait le saut en génie biomédical.

Je tiens aussi à remercier tous mes collègues de travail qui ont tous contribué d'une façon ou d'une autre à la réalisation de ce travail. Un merci particulier à Stéphane Méthot et Dominic Filion avec qui j'ai collaboré étroitement au cours de ces années, ce travail d'équipe m'a beaucoup apporté et a rendu mon projet plus intéressant.

Je remercie également mes parents qui m'ont toujours supporté pendant mon quart de siècle d'études et qui m'ont aidé une fois de plus en acceptant la tâche ingrate de relire ce document pour y déceler les coquilles. Je remercie aussi ma conjointe Jacinthe. Sans toi, je n'aurais pu réaliser ce travail. Merci d'avoir pris soin de notre petite fille au cours des derniers mois.

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail dans un si court délai. Finalement, je suis reconnaissant envers les organismes qui m'ont octroyé des bourses et qui ont ainsi facilité ma vie de doctorant : le CRSNG, le FCAR, les IRSC, la Banque Nationale, la Fondation Joseph-Armand Bombardier, la Financière Sun Life et Biosyntech.

RÉSUMÉ

Le chitosane est un polysaccharide naturel dérivé de la chitine, le biopolymère le plus abondant après la cellulose. Le chitosane est largement utilisé dans le domaine biomédical en raison de son abondance, sa biodégradabilité, sa biocompatibilité, sa faible toxicité et sa propriété d'adhérer aux tissus. Par exemple, des études rapportent l'utilisation d'implants d'un mélange de sang et d'une solution thermosensible composée de chitosane et de glycérol-phosphate (GP) qui favorisent la guérison du cartilage. Le chitosane est aussi utilisé pour la livraison de gènes et des études montrent que la livraison par les voies orale et nasale de complexes chitosane/ADN peut induire une immunisation par ADN. Le chitosane est un polymère linéaire formé de monomères glucosamine et N-acétyl glucosamine et il est défini par son degré de désacétylation (DDA ou f_D), i.e. la fraction de monomères glucosamine, ainsi que par son poids moléculaire (MW). Les propriétés biologiques et physico-chimiques du polymère sont fortement influencées par le DDA et le poids moléculaire. Une mesure précise de ce paramètre est requise par exemple pour des expériences de titrage potentiométrique dans lesquelles la concentration du monomère glucosamine doit être connue avec précision.

La première étude de cette thèse présente la validation d'une méthode de mesure du DDA par RMN du proton. Des chitosanes de DDA compris entre 48 et 100% ont été utilisés pour la validation. La méthode est rapide, simple et plus précise que les autres techniques couramment utilisées telle que la spectroscopie infrarouge (IR) ou le titrage.

La précision, la robustesse, la spécificité, la stabilité et l'exactitude de la méthode sont discutées dans ce chapitre. Les résultats obtenus suggèrent qu'elle devrait être utilisée comme technique de référence pour la mesure de ce paramètre pour tout chitosane soluble.

La deuxième étude de cette thèse a pour objectif de caractériser le comportement acide-base du chitosane et de vérifier l'applicabilité d'un modèle du champ moyen basé sur l'utilisation de l'équation de Poisson-Boltzmann dans la cellule cylindrique. Nous avons évalué l'influence du degré d'ionisation (α) du polymère, du DDA, de la force ionique et de la concentration de chitosane sur la constante de dissociation du polymère, le pK_{ap} . Dans cette étude, nous avons effectué des titrages et des expériences de dilution à température contrôlée de solutions de chitosane de DDA de 0.72, 0.85 et 0.98 à des concentrations de monomères glucosamine allant de 1.875 à 30 mM et des concentrations de sel ajouté allant de 0 à 150 mM. La précipitation du chitosane au cours du titrage était détectée par une mesure de la transmittance. Nous avons observé que la constante de dissociation apparente du chitosane, le pK_{ap} 1) augmente fortement lorsque la concentration du sel augmente 2) augmente fortement avec l'augmentation de la concentration de chitosane pour de faibles concentrations de sel ajouté 3) diminue légèrement avec le DDA. Tous ces effets sur le pK_{ap} sont prédits avec précision par le modèle de Poisson-Boltzmann (PB) dans la cellule cylindrique avec un seul paramètre ajustable, soit la constante de dissociation intrinsèque du chitosane, le $pK_0(T)$. Les

valeurs de pK_0 trouvées à 25°C se situent entre 6.63 et 6.78 pour tous les chitosanes et toutes les conditions de sel testés.

Le degré d'ionisation (α) du chitosane à la précipitation suite à l'ajout d'une base forte (NaOH) a été mesuré et se situe dans une plage de valeurs allant de 0.25 à 0.55. Nous avons observé que la valeur de α à la précipitation 1) augmente avec la concentration de sel 2) augmente fortement avec le DDA. L'effet du sel est imputable à l'écrantage électrostatique accru alors que l'effet de DDA semble être dû au fait que les groupes acétyle empêche l'association chaîne-chaîne et un niveau d'ionisation plus faible pour les valeur de DDA plus faibles est requis pour induire la précipitation.

Dans la troisième étude de cette thèse, nous avons étudié le système thermosensible formé de chitosane et de glycérol-phosphate(GP) qui possède la particularité de présenter une transition sol-gel lorsque chauffé. Tel que mentionné plus haut, ce système est utilisé pour la réparation du cartilage articulaire. Le mécanisme de gélification initialement proposé pour ce système est une intensification des interactions hydrophobes avec la température. Par la suite, une étude a mis en lumière des différences importantes entre les variations en température des pK_a du chitosane et du GP. Cette observation a mené à la proposition d'un nouveau mécanisme selon lequel le chauffage induit un transfert de protons du chitosane vers le GP, neutralisant ainsi le chitosane et permettant aux forces d'attraction intermoléculaires d'induire la formation d'un gel physique (Filion 2005; Filion, Lavertu et al. 2006; Filion, Lavertu et al. 2007).

Dans le but d'étudier et de valider ce mécanisme de thermo-gélification, nous avons effectué des rampes de température sur des solutions diluées de chitosane-GP. Des chitosanes de DDA de 0.72 et 0.98 ont été utilisés pour préparer des solutions avec un ratio molaire GP/glucosamine (monomère du chitosane) se situant entre 1.25 et 10 et avec une quantité de sel monovalent ajouté de 0 ou 150 mM. Des mesures de transmittance étaient effectuées simultanément afin de détecter la précipitation dans ces solutions diluées, précipitation qui correspondrait à la gélification dans des solutions plus concentrées. Les températures de précipitation mesurées se situent entre 15 et 85°C, les solutions avec le moins de GP (utilisé sous la forme d'un sel de disodium) précipitaient à des températures plus élevées. Le modèle théorique basé sur l'équation de PB développé dans la deuxième partie de cette thèse a été utilisé pour prédire la variation du degré d'ionisation du chitosane (α) avec la température et indique qu'une forte diminution de α survient avec l'augmentation de la température. Ce transfert de protons du chitosane vers le GP a été confirmé expérimentalement par des mesures en RMN du phosphore lors de rampes de température puisque le déplacement chimique du ^{31}P du GP est un indicateur du niveau de protonation de ce dernier. En assumant que la valeur de α à la précipitation (α_p) est indépendante de la température, le modèle est en mesure de prédire précisément la température de précipitation (T_p) pour tous les mélanges chitosane-GP. Nous avons observé que les valeurs de α_p sont indépendantes de la température, mais elles augmentent cependant avec le DDA ou la concentration de sel ajouté. Les expériences et la théorie ont montré qu'il est possible d'ajuster et de

prédire T_p en changeant le ratio molaire GP/chitosane pour couvrir une large plage de températures de précipitation.

Finalement, des rampes de températures similaires dans lesquelles le GP était remplacé par du phosphate inorganique ou du MES ont démontrées que ces solutions présentent aussi une précipitation induite par chauffage, confirmant que la caractéristique requise du composé jumelé au chitosane est la capacité d'absorber les protons relâchés par le chitosane sous l'effet de la chaleur. Nous avons obtenu une expression théorique de la variation du degré d'ionisation du chitosane avec la température dans un système composé du chitosane et d'un acide/base. Cette expression permet d'établir les caractéristiques de l'acide/base requises pour que la neutralisation du chitosane induite par chauffage soit efficiente.

La dernière section de la thèse traite d'une étude de transfection in vitro utilisant le chitosane. L'objectif de cette étude est de déterminer l'influence du DDA et du poids moléculaire (MW) du chitosane sur son efficacité de transfection. Afin d'évaluer les effets de ces deux paramètres sur la transfection, nous avons produit des chitosanes de divers DDA (98, 92, 80 et 72%) et nous les avons dépolymérisés à l'acide nitreux afin d'obtenir divers MW (150, 80, 40, 10 kDa). Nous avons produit 64 formulations de complexes chitosane/ADN (16 chitosanes, 2 ratios amine :phosphate (N :P) (5 :1 et de 10 :1) et 2 pH du milieu de transfection (6.5 et 7.1)) dont nous avons caractérisé la taille et la charge et que nous avons testées en transfection in vitro sur des cellules HEK 293.

Plusieurs formulations ont produit des niveaux d'expression du transgène élevés et deux conditions 92-10-5 et 80-10-10 [DDA –MW-N :P] à pH 6.5 étaient similaires au contrôle positif. Les résultats ont révélés un couplage entre le DDA et le MW du chitosane qui est déterminant pour l'efficacité de transfection des complexes. L'expression maximale est obtenue pour une certaine combinaison de DDA et de MW qui dépend du pH et du ratio N :P, mais des niveaux d'expression similaires peuvent être atteints en diminuant le MW et en augmentant le DDA simultanément, et vice-versa. Ces résultats suggèrent que la stabilité des complexes est déterminante pour l'efficacité de transfection.

Je crois que le travail de caractérisation et de modélisation du comportement acide-base du chitosane effectué dans ma thèse doctorale sera utile pour déterminer la valeur de l'état de charge du polymère utilisé dans diverses conditions et permettra un contrôle accru des propriétés de solutions à base de chitosane. J'ai développé un modèle théorique qui permet de prédire la température de précipitation dans le système chitosane-GP qui constitue un outil très utile pour la mise au point de gels de chitosane avec des propriétés de gélification désirées et couvrant une large gamme de températures de gélification. Le mécanisme de gélification par transfert de protons pourrait aussi être mis à profit pour la formation de gel à partir d'autres polyélectrolytes hydrophobes. L'influence observée du DDA et du MW du chitosane sur son efficacité de transfection pourra guider la synthèse de nanoparticules chitosane-ADN avec des propriétés spécifiques requises pour diverses applications ou diverses voies d'administration. Ces

effets du DDA et du MW sur la stabilité des complexes chitosane-ADN pourront être mis à profit en les combinant aux diverses stratégies couramment utilisées pour améliorer l'efficacité des vecteurs non-viraux (i.e. utilisation de ligands, de peptides NLS, de peptides endosmolytiques et stabilisation stérique).

ABSTRACT

Chitosan is a natural polysaccharide derived from chitin, the second most abundant biopolymer after cellulose. Chitosan has been used extensively in the biomedical field due to its abundance, biodegradability, biocompatibility, low toxicity and its mucoadhesive properties. For instance, implants of mixtures of blood and of a thermosensitive solution composed of chitosan and glycerol phosphate have been shown to promote cartilage repair. Chitosan is also used as a gene delivery vector and it has been able to induce DNA-immunization through oral and nasal routes. Chitosan is a linear polymer composed of glucosamine and N-acetyl glucosamine and is defined by its degree of deacetylation (DDA), i.e. the fraction of its monomer that are glucosamine, as well as its molecular weight. The physico-chemical and biological properties of chitosan depend strongly on the DDA and the MW. As an example, an accurate measure of DDA is required in potentiometric titration experiments where the concentration of glucosamine monomer must be known accurately.

In the first part of this thesis, we report the validation of a method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan by ^1H NMR spectroscopy. Chitosans with degrees of deacetylation (DDA) ranging from 48% to 100% have been used for the validation. The method is found to be simple, rapid and more precise than other known techniques like IR or titration for %DDA measurements. The precision, ruggedness, robustness, specificity, stability and accuracy of the technique are discussed

in this chapter. Results obtained suggest that ^1H NMR should be the standard technique for DDA measurement of any soluble chitosan.

The objective of the second study of the thesis is to characterize the acid-base behavior of chitosan and to assess the ability of the nonlinear Poisson-Boltzmann cylindrical cell model to predict the apparent dissociation constant of chitosan at finite concentration, its $\text{p}K_{\text{ap}}$, and the $\text{p}K_{\text{ap}}$ dependence on chitosan ionization, level of deacetylation, concentration of chitosan and medium ionic strength. In this study, we performed temperature-controlled titration and dilution experiments on chitosan solutions with f_{D} of 0.72, 0.85, and 0.98 at concentrations ranging from 1.875mM to 30mM concentration of its glucosamine monomer and with 0 to 150 mM added salt. Light transmittance measurements were performed during titration to detect precipitation. We found that the apparent proton dissociation constant of chitosan ($\text{p}K_{\text{ap}}$) 1) increases strongly with increased salt 2) increases strongly with increased chitosan concentration in low salt conditions and 3) decreases weakly with increasing f_{D} . All of the above influences on chitosan $\text{p}K_{\text{ap}}$ were accurately predicted using a mean-field Poisson–Boltzmann (PB) cylindrical cell model where the only adjustable parameter was the temperature-dependent chitosan intrinsic monomeric dissociation constant $\text{p}K_0(T)$. The resulting chitosan $\text{p}K_0$ values at 25°C were in the range of 6.63 to 6.78 for all chitosans and ionic strengths tested.

The degree of ionization of chitosan when it precipitates upon addition of a strong base was measured to be in the range of 0.25 to 0.55 and was found to 1) increase with

increased salt concentration and 3) increase strongly with f_D . The salt effect was accounted for by the PB model, while the influence of f_D appeared to be due to acetyl groups impeding attractive chain-to-chain association to increase solubility and require reduced ionization levels to precipitate.

The third part of the thesis is devoted to the study of the thermosensitive solutions composed of chitosan and glycerol-phosphate (GP) that undergo a sol-gel transition when heated. As indicated above, these solutions are used as implants for cartilage repair. The first proposed gelling mechanism for these solutions was based on increasing hydrophobic interactions with temperature. Subsequently, an investigation of ionization and precipitation behavior of chitosan revealed important differences in the temperature dependence of the pK_a of chitosan versus GP and led us to propose an alternative hypothesis for the mechanism of gelation in chitosan-GP systems whereby heat induces transfer of protons from chitosan to glycerol phosphate thereby neutralizing chitosan and allowing attractive inter-chain forces to form a physical gel (Filion 2005; Filion, Lavertu et al. 2006; Filion, Lavertu et al. 2007).

In order to investigate this specific molecular thermogelling mechanism, temperature ramp experiments on dilute chitosan-GP solutions were performed. Chitosans with f_D of 0.72 and 0.98 were used to prepare solutions with a range of molar ratios of GP to chitosan glucosamine monomer of 1.25 to 10 and with 0 or 150 mM added monovalent salt. Light transmittance measurements were performed simultaneously to indicate precipitation in these dilute systems as a surrogate for gelation in concentrated systems. Measured temperatures of precipitation ranged from

15 to 85°C, where solutions with less GP (used in a disodium salt form) had higher precipitation temperatures. The theoretical model developed in the second part of this thesis was used to calculate the degree of ionization of chitosan (α , the fraction of protonated glucosamine monomer) as a function of temperature and showed a significant decrease in α with increased temperature due to proton transfer from chitosan to GP. This heat-induced proton transfer from chitosan to GP was experimentally confirmed by ^{31}P NMR measurements during temperature ramp experiments since the chemical shift of ^{31}P of GP is an indicator of its level of protonation. By assuming average temperature independent values of α at precipitation (α_p) that were calculated from measured temperature at precipitation (T_p), the model was able to accurately predict measured T_p of all chitosan-GP mixtures. The resulting α_p were temperature independent but increased with increased chitosan f_D and with increased salt. Measurements and theory revealed that T_p can be adjusted in a predictable manner by changing the chitosan/GP molar ratio and thereby systematically tailored to obtain a large range of precipitation temperatures.

Similar temperature ramp experiments using inorganic phosphate and MES instead of GP demonstrated that the temperature-induced precipitation of chitosan also occurs with these buffers, confirming that the key feature of the buffer used with chitosan is its ability to absorb heat stimulated release of chitosan protons and facilitate chitosan neutralization. A theoretical expression for the variation of chitosan ionization degree with temperature in a system composed of two titratable species (chitosan and buffer) was derived and allowed us to establish the required characteristics of the buffer

for efficient heat stimulated proton transfer between a chitosan and the buffer. These results provide a useful explanation for the mechanism of heat induced gelation of chitosan-based systems that could be exploited for numerous practical applications.

The last part of the thesis is an *in vitro* gene delivery study using chitosan. The objective of this study was to obtain insight into the influence of the molecular weight (MW) and DDA of chitosan on transfection efficiency. To examine the influence of these parameters on gene transfer, we produced chitosans with different DDAs (98, 92, 80 and 72%) and depolymerized them with nitrous acid to obtain different MWs (150, 80, 40, 10 kDa). We produced 64 formulations of chitosan/pDNA complexes (16 chitosans, 2 amine-to-phosphate (N:P) ratios of 5:1 and 10:1 and 2 transfection media pH of 6.5 and 7.1), characterized them for size and surface charge, and tested them for gene transfection in HEK 293 cells *in vitro*. Several formulations produced high levels of transgene expression while two conditions, 92-10-5 and 80-10-10 [DDA-MW-N:P ratio] at pH 6.5, showed equivalence to our best positive control. The results also revealed an important coupling between DDA and MW of chitosan in determining transgene expression. Maximum expression was obtained with a certain combination of DDA and MW that depended on N:P ratio and the pH, but similar expression levels could be achieved by simultaneously lowering MW and increasing DDA or lowering DDA and increasing MW, suggesting a predominant role of particle stability, through co-operative electrostatic binding, in determining transfection efficiency.

I believe that characterisation and modelling of the chitosan acid-base behavior achieved in my doctoral thesis will be useful to determine the ionisation degree of chitosan under various conditions and will enhance control of chitosan solutions properties. I developed a theoretical model that correctly predicts the precipitation temperature of chitosan-GP mixtures and therefore constitutes a very useful tool to guide the preparation of chitosan solutions with predictable gelation properties covering a wide range of gelation temperatures, salt conditions and chitosan f_D . The mechanism of gelation by proton transfer could be used to design gels using other hydrophobic polyelectrolytes. The influence of DDA and MW on chitosan transfection could also guide the synthesis of chitosan-DNA nanoparticles with specific properties adjusted for various applications and routes of administration. This influence of DDA and MW on the stability of chitosan-DNA complexes could be combined with other strategies to improve transfection efficiency of non-viral vectors including the use of targeting ligands, nuclear localisation sequence (NLS) peptides, endosomolytic peptides and steric stabilisation methods.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	iv
REMERCIEMENTS	v
RÉSUMÉ	vi
ABSTRACT	xiii
TABLE DES MATIÈRES.....	xix
LISTE DES TABLEAUX.....	xxv
LISTE DES FIGURES.....	xxvi
LISTE DES ANNEXES.....	xxxv
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	xxxvi
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION	1
1.1 Objectifs et hypothèses	3
1.2 Structure de la thèse	4
CHAPITRE 2 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	7
2.1 Le chitosane	7
2.2 Désacétylation de la chitine	10
2.2.1 Désacétylation hétérogène.....	10
2.2.2 Désacétylation homogène et réacétylation	12
2.3 Caractérisation du chitosane	13
2.3.1 Degré de désacétylation du chitosane	13
2.3.2 Distribution des groupements acétyle.	14
2.3.3 Mesure du poids moléculaire du chitosane	15
2.4 Solubilité et Agrégation du Chitosane	17
2.4.1 Solubilité	17
2.4.2 Agrégation et hydrophobicité.....	18
2.5 Propriétés acide-base du chitosane.....	21
2.5.1 Titration de polyélectrolytes	24

2.6	Dépolymérisation et dégradabilité du chitosane	26
2.6.1	Dépolymérisation	26
2.6.2	Dégradabilité du chitosane	28
2.7	Gels à base de chitosane.....	29
2.8	Livraison de gènes avec le chitosane	30
2.8.1	Mécanisme de transfection.....	32
2.8.2	Influence de la structure du chitosane	35
CHAPITRE 3 : ARTICLE - A VALIDATED ¹ H NMR METHOD FOR THE DETERMINATION OF THE DEGREE OF DEACETYLATION OF CHITOSAN.....		37
3.1	Abstract	37
3.2	Introduction.....	38
3.3	Experimental	40
3.3.1	Materials	40
3.3.2	Samples	41
3.4	Results and Discussion.....	43
3.4.1	Precision	45
3.4.2	Specificity.....	46
3.4.3	Ruggedness.....	47
3.4.4	Robustness.....	48
3.4.5	Stability	48
3.4.6	Accuracy.....	49
3.5	Conclusion	51
CHAPITRE 4 : TITRAGE DU CHITOSANE		61
4.1	Introduction.....	61
4.2	Théorie	62
4.2.1	Paramètres structuraux du modèle de la cellule cylindrique.....	63
4.2.2	Profil des concentrations des contre-ions et des co-ions, valeurs macroscopiques moyennes et activités.....	65

4.2.3	L'Équation de Poisson-Boltzmann.....	66
4.2.4	Expression théorique du pH en fonction de pK_0 , α et $\psi \big _{r=a}$	69
4.2.5	L'électroneutralité et l'équation de Poisson-Boltzmann déterminent α et $\psi \big _{r=a}$	70
4.2.6	Détermination de $pK_0(T)$ et de l'effet de la concentration sur le pK_{ap}	71
4.3	Méthodologie expérimentale.....	73
4.3.1	Réactifs et solutions.....	73
4.3.2	Titrage et dilution	75
4.4	Résultats	78
4.4.1	Influence de la force ionique et du degré de désacétylation (f_D) sur le titrage (pK_{ap} et pK_0) et la précipitation (α_p) du chitosane.	78
4.4.2	Non-linéarité et convexité du $pK_{ap}(\alpha)$ théorique.....	84
4.4.3	Influence de la concentration de chitosane sur le pK_{ap}	87
4.5	Discussion	89
CHAPITRE 5 : ARTICLE - HEAT-INDUCED TRANSFER OF PROTONS FROM CHITOSAN TO GLYCEROL PHOSPHATE PRODUCES CHITOSAN PRECIPITATION AND GELATION		96
5.1	Abstract	96
5.2	Introduction	99
5.3	Theory	103
5.3.1	Determination of pH(T), degree of ionization of chitosan $\alpha(T)$ and temperature of precipitation T_p	104
5.3.2	The cylindrical cell model and the Poisson-Boltzmann equation ..	108
5.3.3	The influence of temperature on the degree of ionization of chitosan in chitosan-GP solutions	112
5.3.4	Determination of changes in chitosan degree of ionization $\alpha(T)$ by ^{31}P NMR	115
5.4	Experimental Methods	117

5.4.1	Reagents and solutions	117
5.4.2	pK_a measurements and temperature ramp experiments	118
5.4.3	^{31}P NMR	121
5.5	Results	122
5.5.1	Influence of temperature on GP pK_a^{GP} and chitosan pK_{ap}	122
5.5.2	Influence of GP concentration c_{GP} and salt concentration c_{NaCl} on pK_a^{GP}	123
5.5.3	Calculation of chitosan pK_{ap} from PB model	124
5.5.4	Temperature dependence of pH of chitosan-GP mixtures	126
5.5.5	Proton transfer from chitosan to GP monitored by ^{31}P NMR	129
5.5.6	Experimental influence of GP concentration c_{GP} deacetylation f_D and salt concentration c_{NaCl} on precipitation temperature T_p	132
5.5.7	PB model prediction of the influence of chitosan concentration c_{GP} deacetylation f_D and salt concentration c_{NaCl} on chitosan ionisation α versus temperature.	135
5.5.8	Critical values of chitosan ionisation at precipitation α_p depend on heterogeneous versus homogeneous processes and the strength of the basic buffer	139
5.5.9	Temperature induced chitosan precipitation can be achieved using buffers other than GP, as long as they satisfy the requirements for proton transfer	143
5.6	Discussion	145
5.7	Appendix I : Derivation of the Dependence of Chitosan Ionisation State α on Temperature	152
5.8	Acknowledgements	157
CHAPITRE 6	: ARTICLE - HIGH EFFICIENCY GENE TRANSFER USING CHITOSAN/DNA NANOPARTICLES WITH SPECIFIC COMBINATIONS OF MOLECULAR WEIGHT AND DEGREE OF DEACETYLATION	158

6.1	Abstract	158
6.2	Introduction	160
6.3	Materials and Methods	163
6.3.1	Materials	163
6.3.2	Bulk Chitosans	164
6.3.3	Preparation of Depolymerized Chitosans	164
6.3.4	Characterization of Depolymerized Chitosans	165
6.3.5	Plasmid DNA	166
6.3.6	Preparation of Chitosan/pDNA Nanoparticles	167
6.3.7	In vitro Transfection	167
6.3.8	Transfection with Chitosan/pDNA Nanoparticle Complexes	168
6.3.9	Transfection with FuGENE 6	169
6.3.10	Transfection with Lipofectamine TM	169
6.3.11	EGFP/Flow Cytometric Determination of Transfection Efficiency	169
6.3.12	Luciferase Determination of Transfection Efficiency	170
6.3.13	Nanoparticle Size and Surface Charge Analysis	171
6.4	Results and Discussion	171
6.4.1	Depolymerization of Chitosan	171
6.4.2	Determination of Transfection Conditions	172
6.4.3	Complex Size	173
6.4.4	Complex Zeta Potential	174
6.4.5	In vitro Transfection	175
6.4.6	Coupling of Formulation Parameters in Determining Transfection Efficiency	180
6.4.7	Formulation Parameters May Primarily Affect Transfection Efficiency by Modulating Nanoparticle Stability	181
6.4.8	Combined Effects of the Formulation Parameters	184
6.5	Conclusion	185
6.6	Acknowledgements	186

CHAPITRE 7 : DISCUSSION GÉNÉRALE	197
CHAPITRE 8 : CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	204
8.1 Recommandations	206
ANNEXE I Démonstration de $\mathbf{dp}K_{\mathbf{ap}} \cong \mathbf{dpH}$	207
RÉFÉRENCES	210

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1. Chemical shifts and T_1 of protons of chitosan at 70°C in D ₂ O/DCl.....	52
Tableau 3.2. Precision test results	53
Tableau 3.3. Ruggedness test results.....	54
Tableau 3.4. Stability test results	55
Tableau 3.5. Accuracy test results.....	56
Tableau 4.1. Chitosanes.	74
Tableau 4.2. Degré d'ionisation du chitosane à la précipitation, α_p , pK_0 et pente de $pK_{ap}(\alpha)$, $\Delta pK_{ap}/\Delta\alpha$, mesurés à 25 °C pour les neuf combinaisons de f_D , c_{NaCl} testées.....	83
Tableau 5.1. Chitosans.	117
Tableau 5.2. Variation of pK_a^{GP} with concentration c_{GP} and salt c_{NaCl} at $T = 25^\circ\text{C}$.	124
Tableau 5.3. Average values of α_p (from Figure 5.7 B)*	137
Tableau 5.4. Comparison of Chitosan Degree of Ionisation at Precipitation from Temperature Ramps on Chitosan/GP Solutions versus Potentiometric Titration with NaOH.	141
Tableau 6.1. Physicochemical Characteristics of Bulk Chitosans	187
Tableau 6.2. Physicochemical Characteristics of Depolymerized Chitosans	187

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1. Structure de (a) la chitine et (b) du chitosane. (c) Structure d'un chitosane partiellement désacétylé (DA = degré d'acétylation). Image tirée de Rinaudo 2006. 10

Figure 2.2. Étapes de la transfection non-virale : 1) formation du complexe vecteur/ADN, le plasmide est condensé par un vecteur cationique approprié 2) le complexe se lie à la cellule par interaction spécifique ou non-spécifique 3) internalisation des complexes dans l'endosome 4) le complexe s'échappe de l'endosome et se retourne dans le cytoplasme 5) transport intracellulaire et internalisation de l'ADN dans le noyau 6) décomplexation. Image tirée de Borchard 2001. 35

Figure 3.1. Acetylated and deacetylated monomers of chitosan 57

Figure 3.2. Chitosan (PCCH00005) ^1H NMR spectrum at 70°C 58

Figure 3.3. PCCH00014 ^1H NMR spectrum at 70°C . The small peak at 2.36 ppm originates from the acetyl protons of chitosan. The rms signal on noise ratio for this peak is approximately 3.1 59

Figure 3.4. PCCH00024 ^1H NMR spectrum at 70°C . The peak at 2.41 ppm originates from acetic acid 60

Figure 4.1. A) Un segment de quatre monomères de chitosane est représenté (deux monomères ionisés, un monomère neutre et un monomère N-acetyl-glucosamine non ionisable). Chaque monomère a une longueur l . B) Le cylindre de rayon a , correspond à la chaîne de chitosane qui est entourée d'ions mobiles qui occupent le reste du volume de la cellule cylindrique qui s'étend jusqu'au rayon b . Des profils représentatifs du potentiel électrostatique $\psi(r)$, de la concentration c_- de contre-ions et de la concentration c_+ de co-ions, sont représentés pour le cas $c_{\text{NaCl}} = 15 \text{ mM}$ à $\alpha = 0.75$ et $f_D = 1.00$. Le cercle indique le potentiel électrostatique à la surface du polyélectrolyte, $\psi|_{r=a}$ 64

Figure 4.2. Le montage expérimental effectuant les titrages à température contrôlée tout en enregistrant la température, le pH et la transmittance (L_T) des solutions. La température est contrôlée par un bain circulant et l'intensité du laser transmise au travers

du bécher à double paroi et de la solution est mesurée par un photodétecteur. Ce montage a été mis au point par Dominic Filion (Filion 2005).....76

Figure 4.3. Transmittance (L_T) et volume de titrant ajouté (V_T) en fonction du temps. La première diminution de L_T (cercle) résultant de la précipitation du chitosane survient ici après un ajout de 3.3 mL de NaOH 0.01N. La valeur de α_p est déterminée à partir de Eq 4.14 en utilisant les concentrations connues de Na^+ , Cl^- and c_p à cette valeur de V_T . 77

Figure 4.4. Courbes de $\text{p}K_{\text{ap}}(\alpha)$ du chitosane à 25°C (moyenne $\pm$ SD, $n = 3$) pour neuf combinaisons de f_D et c_{NaCl} comparées aux prédictions du modèle PB (lignes continues). Les symboles gris représentent des données recueillies après la précipitation. Les courbes théoriques sont obtenues en utilisant $a = 1.3$ nm (rayon du polyélectrolyte) et $l = 0.52$ nm (distance entre les sites chargés sur la chaîne) et en ajustant ensuite $\text{p}K_0(T)$ tel que décrit dans la section 4.2.6. La dilution résultant de l'ajout de titrant est prise en compte dans les calculs. 80

Figure 4.5. Le potentiel électrostatique normalisé $\bar{\psi}(r) = e\psi(r)/kT$, solution de l'équation PB, de la surface du macroion ($r = a = 1.3$ nm) jusqu'à la périphérie de la cellule cylindrique ($r = b$). La valeur de b varie avec la concentration en C selon Eq 4.2 et avec α en raison de la dilution due à l'ajout de titrant. Soulignons que b varie aussi avec f_D puisque c'est la concentration initiale de monomères qui est constante (3 mM) et non pas c_p dans Eq 4.2. Les courbes théoriques ont été obtenues pour mettre en évidence l'effet des paramètres suivants: (A) la concentration de sel ajouté, c_{NaCl} , (B) le degré de désacétylation, f_D , (C) la concentration de chitosane représentée par la concentration de monomère glucosamine c_g à 25°C et (D) la température T (la permittivité relative de l'eau utilisée est de 86, 78, and 74 à 278, 298 et 310 K, respectivement (valeurs prises dans l'Annexe 1.1 du livre *Electrolyte Solutions* (Robinson and Stokes 2002))). $\bar{\psi}(r) = e\psi(r)/kT$ augmente lorsque α ou f_D augmente et lorsque c_{NaCl} ou la concentration de chitosane diminue alors qu'aucun changement significatif du potentiel normalisé n'est observée lorsque la température est variée. 81

Figure 4.6. Courbes de $pK_{ap}(\alpha)$ du chitosane à 25°C (moyenne $\pm$ SD, $n = 3$) pour neuf combinaisons de f_D et c_{NaCl} comparant directement les trois chitosanes testés. Les régressions linéaires sont représentées par des lignes discontinues. Les solutions de chitosanes de concentration en monomère glucosamine de 3 mM ont été titrées avec du NaOH 0.01 N, tel que décrit dans la Méthodologie. Pour plus de clarté, seuls les points obtenus dans la zone de solubilité du chitosane sont présentés (voir **Figure 4.4.** pour les données dans la zone de précipitation).....82

Figure 4.7. Courbes de $pK_{ap}(\alpha)$ théoriques (lignes continues et discontinues) comparées aux régression linéaires effectuées sur ces mêmes courbes théoriques (lignes pointillées adjacentes). Ces régressions sont effectuées dans la zone non-précipitée (**Figure 4.4** et **Tableau 4.2**) et pour $\alpha \leq 0.90$. $pK_0 = 6.7$, $a = 1.3$ nm et une concentration de monomère glucosamine de 3 mM sont utilisés dans le modèle PB. A) Calculs avec $f_D = 0.98$ pour des solutions contenant 1) aucun sel, aucun co-ion et du HCl ajouté pour varier α 2) aucun sel mais des co-ions, une quantité constante de HCl à un ratio molaire HCl:glucosamine de 1:1 et du NaOH ajouté pour varier α et 3) comme en 2) mais avec 150 mM de NaCl ajouté. Les régressions ont été effectuées dans les plages $0.55 < \alpha < 0.90$ et $0.6 < \alpha < 0.90$ pour $c_{NaCl} = 0$ mM et $c_{NaCl} = 150$ mM, respectivement. Le pK_0 obtenu par extrapolation des régressions linéaires est inférieur au pK_0 trouvé avec le modèle PB en raison de la non-linéarité et de la convexité du modèle. B) Comparaison des chitosanes avec $f_D = 0.72$ et $f_D = 0.98$ pour les cas sans sel et sans co-ions. Les régressions linéaires ont été effectuées sur les intervalles $0.30 < \alpha < 0.90$ et $0.55 < \alpha < 0.90$ pour $f_D = 0.72$ et $f_D = 0.98$, respectivement.....86

Figure 4.8. Influence de la concentration du chitosane (concentration de monomère glucosamine, c_{gluc}) sur son pK_{ap} à 25°C ($\Delta pK_{ap}(c_{gluc}) = pK_{ap}(c_{gluc}) - pK_{ap}(c_{gluc} = 30\text{mM})$). A) Dilution du chitosane ($f_D = 0.72$) à un ratio molaire HCl:glucosamine de 0.75. Les lignes continues correspondent au modèle PB. B) Le modèle PB pour un chitosane ($f_D = 0.72$) dissout à un ratio molaire HCl:glucosamine de 0.75 et dilué ensuite avec des

solutions de NaCl de diverses concentrations. La concentration en NaCl de la solution de chitosane est la même que celle de la solution utilisée pour la dilution. 88

Figure 5.1. Laser transmittance (L_T) and pH during a temperature ramp ($1^\circ\text{C}/\text{min}$) of a chitosan-GP solution ($c_g = 1.5 \text{ mM}$, $r = \bar{c}_{\text{GP}}/c_g = 2.5$). The temperature of chitosan precipitation (T_p) was found as the intercept of the extrapolated transmittance (L_T) baseline before precipitation with the extrapolated transmittance (L_T) after precipitation. The pH showed a similar decrease at precipitation, likely due to increased charge density local to chitosan aggregation that promoted proton release to a greater extent than that predicted from the $\text{p}K_a$ variation with temperature of soluble chitosan..... 120

Figure 5.2. Variation of the $\text{p}K_a$'s of chitosan and GP with temperature (mean $\pm$ min/max, $n = 2$) in a ramp test ($1^\circ\text{C}/\text{min}$). The chitosan solution had $\alpha = 0.75$ and the GP solution had $\chi = 0.5$ with $c_{\text{NaCl}} = 150 \text{ mM}$ for both. Polynomials of degree 2 (Eq 5.3 and Eq 5.4) were fit to the data and are shown as solid lines. The resulting best fit parameters were $A_g = -2.32 \times 10^{-2}$ and $B_g = 6.57 \times 10^{-5}$ in Eq 5.4 for chitosan and $A_{\text{GP}} = 1.36 \times 10^{-3}$ and $B_{\text{GP}} = 3.04 \times 10^{-5}$ in Eq 5.5 for GP both with reference temperature $T_0 = 25^\circ\text{C}$ 122

Figure 5.3. Theoretical dependence of chitosan $\text{p}K_{\text{ap}}$ at constant temperature (25°C) on the degree of ionization, α , for certain combinations of f_D , c_{GP} and c_{NaCl} . These PB model results were obtained using $c_g = 1.5 \text{ mM}$, $a = 1.3 \text{ nm}$ (polyelectrolyte radius) and $l = 0.52 \text{ nm}$ (charged sites spacing on the chain). 125

Figure 5.4. Experimental $\text{pH}(T)$ (symbols) compared to theoretical pH (lines) vs temperature for various chitosan/GP mixtures ($c_g = 1.5 \text{ mM}$) where $r = \bar{c}_{\text{GP}}/c_g$, subjected to ramp tests at $1^\circ\text{C}/\text{min}$. Open white symbols correspond to values obtained after chitosan precipitation. 127

Figure 5.5. Different slopes of experimentally measured pH of chitosan-GP and theoretically calculated chitosan $\text{p}K_{\text{ap}}$ vs temperature indicate decreasing degree of ionization of chitosan during this temperature ramp. The degree of chitosan ionization, α , can be calculated from Eq 5.1 as $\alpha = \frac{1}{1+10^\Delta}$ where $\Delta = \text{pH}(T) - \text{p}K_{\text{ap}}(T)$ is specifically indicated as $\Delta(10^\circ\text{C}) = 0.21$ and as $\Delta(25^\circ\text{C}) = 0.44$ to provide $\alpha = 0.38$ at 10°C and a

reduced $\alpha = 0.27$ at 25°C. In this case precipitation occurs at 25°C and is indicated by an abrupt change in slope of measured pH vs T. This accelerated decrease of pH is not reflected in the calculated pK_{ap} since the latter assumes a soluble macroion in homogeneous equilibrium with respect to proton dissociation. On the contrary, chitosan precipitation will condense chitosan to increase local charge density thus reducing pK_{ap} and expelling protons from chitosan. 128

Figure 5.6. Chitosan degree of ionization from ^{31}P NMR. A) Measured ^{31}P chemical shift of GP vs pH (symbols) and best fits of Eq 5.20 to data resulting in ($\delta_a = 0.017$, $\delta_b = 3.704$, $pK_a = 6.26$) at 5°C, ($\delta_a = 0.243$, $\delta_b = 4.074$, $pK_a = 6.21$) at 25°C and ($\delta_a = 0.530$, $\delta_b = 4.551$, $pK_a = 6.28$) at 55°C for $c_{GP} = 5$ mM and $c_{NaCl} = 150$ mM. B) Temperature dependence of ^{31}P chemical shift of GP (symbols, mean $\pm$ min/max, $n=2$) for two chitosan-GP solutions both with $c_g = 1.5$ mM, $c_{NaCl} = 150$ mM compared to the chemical shifts of the pure acid form $\delta_a(T)$ and base form $\delta_b(T)$. Upon heating, the ^{31}P chemical shift of the chitosan-GP mixtures approaches $\delta_a(T)$ for both solutions, indicating that the proportion of GP^- vs GP^{2-} in the solution increases with temperature by taking protons from chitosan that is progressively neutralized (α decreases when χ increases according to Eq 5.7 or Eq 5.21). Open white symbols correspond to values obtained after chitosan precipitation. C) The degree of ionization of chitosan calculated from Eq 5.21 using ^{31}P chemical shifts is in reasonable agreement with that predicted by solving Eq 5.1, Eq 5.2, Eq 5.3, Eq 5.4 and Eq 5.7 as described in the theory section. Both NMR measurements and the theory indicate a reduction in α of chitosan when heated on the order of 0.07 per 10°C..... 131

Figure 5.7. A) Temperature of precipitation of chitosan-GP mixtures from ramp tests at 1°C/min, as a function of the molar ratio of GP to glucosamine ($r = c_{GP}/c_g$) (mean $\pm$ SD, $n=3$ or $\pm$ min/max, $n=2$). The continuous lines are added for clarity and do not represent any model calculation. B) Degree of ionisation at precipitation α_p vs temperature for all solutions tested. The value of α_p was calculated from experimentally measured T_p using the PB model. The value of α_p does not change significantly with

temperature. The largest variation with temperature occurs for the case $f_D = 0.98$ without added salt where α_p decreases slightly with temperature (from 0.19 at 15°C to 0.14 at 65°C), possibly due to the reduced content of mobile ions for these solutions with higher T_p 134

Figure 5.8. PB model predictions of chitosan ionisation α vs T for various GP/Glucosamine molar ratios ($r = c_{GP}/c_g$). The calculations were performed for chitosan at $c_g = 1.5$ mM with $f_D = 0.72$ and $c_{NaCl} = 150$ mM. The shaded grey area indicates the zone of chitosan precipitation where $\alpha \leq \alpha_p = 0.15$ corresponding to the experimentally determined α_p for $f_D = 0.72$ and $c_{NaCl} = 150$ mM (from Figure 5.7). The intersection between curves and the grey zone corresponds to the precipitation temperature T_p . Chitosan-GP solutions with lower r required higher temperatures to reach the grey zone and precipitate. 136

Figure 5.9. Comparison of experimental and calculated PB model values of precipitation temperature T_p from ramp tests at 1°C/min with $c_g = 1.5$ mM, as a function of the molar ratio of GP to chitosan glucosamine ($r = c_{GP}/c_g$) (mean $\pm$ SD, $n=3$ or $\pm$ min/max, $n=2$). The PB model predictions are shown as long-dashed lines and assume constant temperature independent α_p from **Tableau 5.3** A) $c_{NaCl} = 150$ mM. The dependence of T_p on f_D was accounted for by setting $\alpha_p = 0.15$ for $f_D = 0.72$ and $\alpha_p = 0.28$ for $f_D = 0.98$, consistent with increased acetylation increasing solubility B) $c_{NaCl} = 0$ mM. The dependence of T_p on f_D was accounted for by setting $\alpha_p = 0.12$ for $f_D = 0.72$ and $\alpha_p = 0.18$ for $f_D = 0.98$ and are lower than the added salt case due to reduced electrostatic screening. C) Effect of the salt on T_p for $f_D = 0.72$. Here again, $\alpha_p = 0.12$ for no added salt and $\alpha_p = 0.15$ for $c_{NaCl} = 150$ mM. Interestingly T_p was higher in the presence of salt although α_p was also higher. This salt effect was mediated by a reduced GP pK_a^{GP} in the presence of added salt (**Tableau 5.3**) thus increasing the initial state of ionisation of chitosan prior to heating.....138

Figure 5.10. Comparison of light transmittance (L_T) in titration experiments of chitosan with NaOH (A) versus with GP (B). A: Titration with 10 mM NaOH of a

chitosan solution with $c_g = 3$ mM, $c_{HCl} = 3$ mM (initial volume of 20 mL) where 0.3 mL of NaOH (pH 12) was added every 2 minutes. The intensity L_T profile reveals an initial fast creation of local chitosan precipitates at the 20 minute injection (circle 1) followed by a slower decrease in L_T at 36 minutes (circle 2). The latter probably occurs when chitosan throughout the solution has an average ionization degree that is low enough to precipitate throughout the solution rather than just locally at the point of titrant injection.

B: Titration with 30 mM GP of a chitosan solution with $c_g = 3$ mM, $c_{HCl} = 3$ mM (initial volume of 20 mL) where 2 mL of GP (pH 9) was added every 2 minutes. In the case of GP addition the L_T profile does not show any evidence of local precipitation but only a slow and continuous precipitation (circle in B) consistent with lower pH and larger injection volume of GP vs NaOH resulting in a more homogeneous process. 142

Figure 5.11. L_T profile of chitosan/phosphate and chitosan/MES mixtures as a function of temperature. A solution of MES 15 mM prepared at a molar ratio MES:NaOH of 1:1 was mixed with chitosan ($f_D = 0.98$) and a solution of phosphate disodium salt 5 mM was mixed with chitosan ($f_D = 0.72$). Both of these solutions satisfy the requirements for proton transfer and resulting chitosan precipitation upon heating. 144

Figure 6.1. Percentage of HEK 293 cells that were transfected *in vitro* using complexes made with chitosans BST-80 (40 kDa) and BST-72 (80 kDa). Cells were incubated 48 hours in 24-well culture plates with complexes at A) Different amine:phosphate (N:P) ratios with fixed 2.5 μ g of pDNA/well and fixed transfection media pH of 7.1; B) Different pH with fixed N:P ratio of 7:1 and fixed 2.5 μ g of pDNA/well; C) Different amounts of pDNA/well with fixed pH of 7.1 and fixed N:P of 7:1. Mean $\pm$ SD (n= 4-5). 188

Figure 6.2. Size of chitosan/pDNA complexes made with chitosans of different degrees of deacetylation and molecular weights. Two different N:P ratios were used (5:1 and 10:1) as well as two different pH (6.5 and 7.1) of the suspension buffer (PBS) in which size was measured. Mean with error bar showing minimum and maximum. 189

Figure 6.3. Zeta potential of chitosan/pDNA complexes made with chitosans of different degrees of deacetylation and molecular weights. Two different N:P ratios were used (5:1 and 10:1) as well as two different pH (6.5 and 7.1) of the suspension buffer (PBS) in which zeta potential was measured. Mean with error bar showing minimum and maximum.....190

Figure 6.4. Percentage of HEK 293 cells that were transfected *in vitro* using complexes made with chitosans of different degrees of deacetylation and molecular weights. Cells were incubated for 48 hours in 24-well culture plates with complexes made with amine:phosphate ratios of 5:1 and 10:1, using transfection media pH of 6.5 and 7.1 as well as fixed 2.5 µg of pDNA/well. FuGENE 6, the positive control resulted in $77.7 \pm 2.6\%$ at pH 6.5 and $82.6 \pm 2.3\%$ at pH 7.1. Mean $\pm$ SD (N=5).....191

Figure 6.5. Transgene expression by HEK 293 cells transfected *in vitro* using complexes made with chitosans of different degrees of deacetylation and molecular weights. Cells were incubated for 48 hours in 24-well culture plates with complexes made with amine:phosphate ratios of 5:1 and 10:1, using transfection medium pH of 6.5 and pH 7.1, and fixed 2.5 µg of pDNA/well. The relative light units (RLU) were normalized to the protein content of each sample. The different formulations were compared to control cells (C), pDNA alone (D) as a negative control as well as Lipofectamine™ (L) and FuGENE 6 (F) as positive controls. An asterisk (*) indicates similar expression levels since a Mann-Whitney test with $p=0.05$ showed no significant difference. Mean $\pm$ SD (N=4-6).....193

Figure 6.6. Transgene expression quantified by a luciferase assay correlated with the percentage of transfected cells measured by flow cytometry detection of GFP using a plasmid containing both reporters. The pH of the transfection medium needs to be accounted for when relating these two parameters. Linear Regression resulted in Pearson product moment correlation coefficients of 0.91, $p<0.0001$ (pH 6.5) and 0.94, $p<0.0001$ (pH 7.1). Dashed lines display 95% confidence intervals. 195

Figure 6.7. Contour plot of normalized transgene expression of HEK 293 cells as a function of degree of deacetylation (DDA) and molecular weight (MW) of chitosans

used to make complexes. In each plot, transgene expression was normalized to the highest expression level obtained with this particular N:P ratio and transfection medium pH..... 196

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE I	Démonstration de $\text{dp}K_{\text{ap}} \cong \text{dpH}$	207
-----------------	--	------------

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

a : rayon du polyélectrolyte dans la cellule cylindrique

ADN ou DNA : acide désoxyribonucléique

A_g, A_{GP} : coefficient du terme de degré 1 de la fonction quadratique utilisée pour décrire la dépendance en température du pK_a du chitosane et du GP, respectivement

a_{H^+} : activité du proton

α : degré d'ionisation du chitosane

α_p : degré d'ionisation du chitosane à la précipitation

b : rayon de la cellule cylindrique

B_g, B_{GP} : coefficient du terme de degré 2 de la fonction quadratique utilisée pour décrire la dépendance en température du pK_a du chitosane et du GP, respectivement

$c_{\pm}^0$: concentration de référence des cations (+) et des anions (-) mobiles

$\bar{c}_{\pm}$: concentration moyenne des cations (+) et des anions (-) mobiles

c_g ou c_{gluc} : concentration de monomères de glucosamine

c_g^+ : concentration de monomères de glucosamine ionisés

c_{GP} : concentration de glycerol-phosphate (GP)

$c_i(r)$: profil de concentration radial de l'espèce chimique i

c_{NaCl} : concentration de chlorure de sodium (NaCl)

c_p : concentration moyenne du polymère (monomères)

χ : fraction de glycérol-phosphate sous la forme monovalente

DDA : degré de désacétylation du chitosane

DMEM : milieu de culture, Dubecco's Modified Essential Medium

δ : déplacement chimique

δ_a : déplacement chimique du phosphore sous la forme monovalente

δ_b : déplacement chimique du phosphore sous la forme divalente

e : charge électrique élémentaire

ε : permittivité de l'eau

ε_0 : permittivité du vide

f_D : fraction de monomères glucosamine (équivalent du DDA)

GlcNH₂ : monomère de glucosamine sous la forme neutre

GlcNH₃⁺ : monomère de glucosamine ionisé

GP : glycérol-phosphate

GP⁻ : glycérol-phosphate monovalent

GP²⁻ : glycérol-phosphate divalent

γ_i : coefficient d'activité de l'espèce chimique i

HEK 293 : Lignée cellulaire, Human Embryonic Kidney cell line 293

k : constante de Boltzmann

l : longueur structurale d'un monomère de chitosane

L_T : transmittance

M_n : masse molaire moyenne en nombre

M_w : masse molaire moyenne en masse

μ_i^0 : potentiel chimique standard de l'espèce chimique i

N_A : nombre d'Avogadro

N:P : ratio amine :phosphate

NLS : nuclear localisation signal

NPC : nuclear pore complex

PB : Poisson-Boltzmann

pDNA : ADN plasmide

pK_0 : constante de dissociation intrinsèque du chitosane

pK_0^{lin} : valeur du pK_0 obtenue par extrapolation linéaire de la courbe de titrage

pK_0^{PB} : valeur du pK_0 obtenue par la résolution de l'équation de Poisson-Boltzmann

pK_a : constante de dissociation

pK_{ap} : constante de dissociation apparente

pK_w : constante de dissociation de l'eau

r : rapport de la concentration de glycérol-phosphate et de monomère de glucosamine

RMN ou NMR : résonance magnétique nucléaire

SD : écart-type

σ : densité surfacique de charge

T : température

$\psi(a)$: potentiel électrostatique à la surface du polyélectrolyte

$\psi(r)$: potentiel électrostatique dans la cellule cylindrique

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION

Le chitosane est un polysaccharide naturel largement utilisé dans le domaine biomédical en raison de son abondance, sa biodégradabilité, sa biocompatibilité, sa faible toxicité et sa propriété d'adhérer aux tissus. Les applications biomédicales de ce polymère sont nombreuses et on compte parmi celles-ci : les sutures chirurgicales, les implants dentaires, la peau artificielle, la réparation de l'os, les lentilles cornéennes, la livraison de médicaments, la livraison de gènes (Rinaudo 2006). Le chitosane trouve aussi des applications dans d'autres domaines tels que l'agriculture, le traitement des eaux usées, les cosmétiques et l'alimentation.

Récemment, un gel physique thermosensible à base de chitosane et de glycérol-phosphate (BST-Gel[®]) a été développé par la compagnie Biosyntech (Chenite, Chaput et al. 2000). Ce gel est obtenu à partir de solutions de chitosane et de glycérol-phosphate (GP) qui présentent la particularité de geler lorsque chauffées. Cet hydrogel peut être injecté ou appliqué de façon locale à des sites spécifiques et présente des propriétés thérapeutiques qui favorisent la réparation locale de tissus endommagés tel que le cartilage et l'os. Il a été démontré que des implants composés d'un mélange de ce gel et de sang favorisent la réparation du cartilage (Hoemann, Hurtig et al. 2005). Il a été démontré que ces implants améliorent la réparation du cartilage en influençant les étapes initiales du processus de réparation, en favorisant la migration de cellules de l'os sous-chondral dans la lésion du cartilage et en augmentant l'angiogénèse transitoire

(Chevrier, Hoemann et al. 2007). La propriété thermosensible du système chitosane-GP lui confère la propriété unique de pouvoir être injecté sous forme liquide et de geler in situ à la température du corps. Le mécanisme initialement proposé pour la gélification du système chitosane-GP est une intensification des interactions hydrophobiques avec la température (Chenite, Buschmann et al. 2001; Cho, Heuzey et al. 2005). Cependant, des études de la variation en température des constantes de dissociation du chitosane et du GP nous ont amené à proposer que la thermogélification pourrait être induite par un transfert de protons du polymère vers le GP qui mène à une neutralisation du chitosane et à la gélification (Filion 2005; Filion, Lavertu et al. 2006; Filion, Lavertu et al. 2007).

L'objectif principal de la livraison de gènes est le développement de véhicules de livraison efficaces, non-toxiques qui soient en mesure d'encapsuler et de livrer in vivo du matériel génétique thérapeutique dans des cellules spécifiques. Les inconvénients associés aux vecteurs viraux (risque de réponses immunologiques, risque d'activation d'oncogènes (Somia and Verma 2000; Ferber 2001)) ont stimulé la recherche sur les systèmes non-viraux qui sont cependant beaucoup moins efficaces que les virus. Le chitosane est un polycation qui peut condenser l'ADN et il est l'un des polymères naturels les plus utilisés pour la livraison de gènes. Des études montrent que la livraison par les voies orale et nasale de complexes chitosane/ADN peut induire une immunisation par ADN (Roy, Mao et al. 1999; Iqbal, Lin et al. 2003; Kai and Ochiya 2004). Une application potentielle est de compléter les implants de chitosane-GP/sang avec des nanoparticules de chitosane/ADN afin d'exprimer des protéines

thérapeutiques in vivo favorisant la réparation du cartilage articulaire. L'efficacité de transfection du chitosane dépend de nombreux paramètres : le pH, le ratio chitosane/ADN et les propriétés du chitosane. L'effet combiné du poids moléculaire et du DDA du chitosane sur son efficacité de transfection n'a pas été testé de façon systématique. On suggère qu'il doit exister un équilibre entre la protection de l'ADN (meilleure pour MW élevé) et l'efficacité de la dissociation intracellulaire des composantes des polyplexes (facilitée pour MW faible) (Koping-Hoggard, Varum et al. 2004). La structure du chitosane semble déterminante pour la stabilité des complexes qu'il forme avec l'ADN et devrait influencer le potentiel de transfection (Strand, Danielsen et al. 2005).

1.1 Objectifs et hypothèses

Un objectif de ce travail de recherche est de mieux comprendre le mécanisme de thermogélification du système chitosane-GP et de développer un modèle théorique qui soit en mesure de prédire la température de cette transition. L'hypothèse est que la gélification est le résultat d'une neutralisation par un transfert de protons du chitosane vers le GP induit par chauffage et non pas une intensification avec la température des interactions hydrophobiques. Même si une telle intensification peut survenir, on suppose que c'est la force de répulsion électrostatique entre les chaînes de chitosane qui est la plus fortement modulée par la température et que c'est cette dernière qui est déterminante pour la gélification.

Un autre objectif de la thèse est de déterminer l'influence de la masse molaire et du degré de désacétylation du chitosane sur son efficacité de transfection. L'hypothèse est que ces deux paramètres influencent la stabilité des complexes de chitosane-ADN qui est déterminante pour l'efficacité de transfection. Il est suggéré qu'il doit exister un équilibre entre la stabilité et l'efficacité de la dissociation intracellulaire des composantes des complexes pour que la transfection soit optimale. Cet aspect du projet constitue une première étape dans la mise au point de nanoparticules de chitosane-ADN qui seront utilisées pour compléter les implants de chitosane-GP/sang utilisés pour la réparation du cartilage.

1.2 Structure de la thèse

Une revue de la littérature traitant des propriétés du chitosane et de son utilisation pour la livraison de gènes est présentée au CHAPITRE 2. Le DDA est un paramètre qui influence fortement les propriétés physiques et biologiques du chitosane. Une mesure précise de ce paramètre est particulièrement importante pour des expériences de titrage potentiométrique dans lesquelles la concentration du monomère glucosamine doit être connue avec précision. Dans le CHAPITRE 3, on présente un article (publié) dans lequel nous avons validé une technique de mesure du DDA par RMN du proton. Des chitosanes de DDA allant de 48 à 100% ont été caractérisés. La précision, la robustesse, la stabilité, la spécificité ainsi que l'exactitude de la méthode sont discutées.

Une meilleure compréhension du mécanisme de gélification du chitosane-GP est requise pour un meilleur contrôle des propriétés de ce système. La validation du mécanisme proposé selon lequel la gélification induite par chauffage est le résultat d'un transfert de protons du chitosane vers le GP requiert une connaissance précise de propriétés acide-base du chitosane et du GP ainsi que de l'effet de la température sur ces dernières. La caractérisation du chitosane est rendue plus difficile par son insolubilité à faible degré d'ionisation et par le fait que c'est un polyélectrolyte et que sa constante de dissociation dépend donc du degré d'ionisation. Le CHAPITRE 4 présente une étude des propriétés acide-base du chitosane et constitue la première étape de caractérisation des composantes du système chitosane-GP. Les effets du degré d'ionisation, du DDA, de la concentration de sel et de la concentration de chitosane ont été testés et sont discutés. Un modèle du champ moyen basé sur l'application de l'équation non-linéaire de Poisson-Boltzmann dans la cellule cylindrique est proposé pour prédire le comportement acide-base du chitosane.

Dans le CHAPITRE 5, une étude du système chitosane-GP est présentée sous la forme d'un article (soumis). On y a étudié la précipitation induite par chauffage dans des solutions diluées de chitosane-GP présents dans des proportions variables. L'influence du DDA et de la concentration de sel ajouté a été testée et discutée. Un modèle basé sur l'équation de Poisson-Boltzmann présenté au CHAPITRE 4 incluant le GP ainsi que les dépendances en température du pK_a du GP et de la constante de dissociation intrinsèque

du chitosane est proposé pour prédire la température de précipitation de solutions de chitosane-GP.

Tel que mentionné plus haut, l'influence combinée du poids moléculaire et du degré de désacétylation sur l'efficacité de transfection du chitosane n'a pas été testée de façon systématique dans la littérature. Ces paramètres sont susceptibles d'influencer la stabilité de complexes chitosane-ADN et par le fait même leur efficacité de transfection. Les résultats d'une étude de transfection in vitro dans laquelle 16 chitosanes (4 DDA x 4 MW) sont présentés sous la forme d'un article (publié) au CHAPITRE 6. Un parallèle entre les niveaux de transfection obtenus et l'influence combinée du DDA et du MW sur la stabilité des complexes y est établi. Suivent ensuite les chapitres de discussion et de conclusion générales.

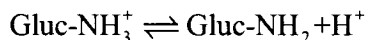
CHAPITRE 2 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 Le chitosane

Le chitosane est un polysaccharide cationique naturel obtenu par une désacétylation alcaline partielle ou complète de la chitine (Hoppe-Seyler 1894), biopolymère que l'on retrouve principalement dans l'exosquelette des crustacés, des mollusques et des insectes (Roberts 1992). Il existe deux allomorphes de la chitine, la forme α et la forme β (Rinaudo 2006). Dans les structures cristallines proposées pour les deux formes de la chitine, les chaînes sont organisées en feuilles qui sont stabilisées par un certain nombre de ponts hydrogène intra-feuille. Dans la forme α , des ponts hydrogène inter-feuille sont aussi présents (Salmon and Hudson 1997) La forme β ne possède pas de liens hydrogène inter-feuille et elle est donc plus susceptible au gonflement intra-cristallin (Rinaudo 2006). C'est la forme α qui est la plus stable et la plus répandue (Rinaudo 2006). Parce que la chitine α possède une structure hautement cristalline, elle est peu soluble dans la plupart des solvants organiques ainsi que dans l'eau (Cho, Jang et al. 2000)

Le chitosane est le dérivé principal de la chitine. Il consiste en une chaîne linéaire composée de monomères glucosamine et N-acétyl-glucosamine unis par un lien glycosidique β -(1 $\rightarrow$ 4) (**Figure 2.1** en page 10). La chitine est constituée principalement de monomère N-acétyl-glucosamine et le processus de désacétylation rend possible la

solubilisation du chitosane en milieu acide via la protonation du groupe -NH_2 des monomères glucosamine (Rinaudo 2006). En solution, l'équilibre suivant s'établit :



où Gluc-NH_3^+ et Gluc-NH_2 correspondent au monomère glucosamine ionisé et neutre, respectivement. Cet équilibre est discuté plus en détails dans la section traitant des propriétés acide-base du chitosane (section 2.5).

Le chitosane est défini par son degré de désacétylation (DDA ou f_D) qui correspond à la fraction de monomères glucosamine du polymère, ainsi que par sa masse molaire (MW). Le DDA ainsi que le MW varient dans la population polydisperse de chaînes de polysaccharides résultant des processus de désacétylation et de purification. La distribution des groupes acétyle (hétérogène/en bloc vs homogène/aléatoire) est un autre paramètre important qui influence de façon significative les propriétés physiques et biologiques du polymère (Kurita, Sannan et al. 1977; Aiba 1991; Otterlei, Varum et al. 1994; Cho, Jang et al. 2000; Gori 2002). Notons que les termes chitine et chitosane décrivent un continuum de copolymères constitués de monomères N-acetyl-glucosamine et de monomères glucosamine que l'on distingue par leur insolubilité ou leur solubilité en milieu aqueux acide (Roberts 1992). Lorsque le DDA de la chitine atteint environ 50% (dépendamment de la source du polymère), elle devient soluble en milieu aqueux acide et on parle alors de chitosane (Sannan, Kurita et al. 1976).

Le chitosane est largement utilisé dans le domaine biomédical en raison de son abondance, sa biodégradabilité, sa biocompatibilité, sa faible toxicité et sa propriété d'adhérer aux tissus (Shigemasa and Minami 1996). Plusieurs études ont démontré que le chitosane stimule la réparation de tissus dermaux, de tissus cornéens, de tissus mous et de tissus durs (Muzzarelli, Bicchiera et al. 1992; Okamoto, Shibasaki et al. 1995, (Sall, Kreter et al. 1987; Ueno, Yamada et al. 1999; Park, Lee et al. 2000). Il a été démontré que des implants de chitosane/glycerol phosphate améliorent la réparation du cartilage articulaire (Hoemann, Hurtig et al. 2005). Le chitosane est hémostatique car il forme des chaînes avec les érythrocytes et active les plaquettes (Malette, Quigley et al. 1983; Rao and Sharma 1997; Chou, Fu et al. 2003). Dans l'organisme, le chitosane est dégradé par voie enzymatique (Muzzarelli 1997; Varum, Myhr et al. 1997) et ensuite éliminé dans l'urine (Onishi and Machida 1999). Puisque le chitosane est un polyélectrolyte cationique et qu'il peut condenser l'ADN, il est utilisé pour la livraison de gènes (Mumper and Rolland; MacLaughlin, Mumper et al. 1998; Roy, Mao et al. 1999). Une revue plus détaillée de cette application du chitosane est présentée dans ce chapitre (section 2.8).

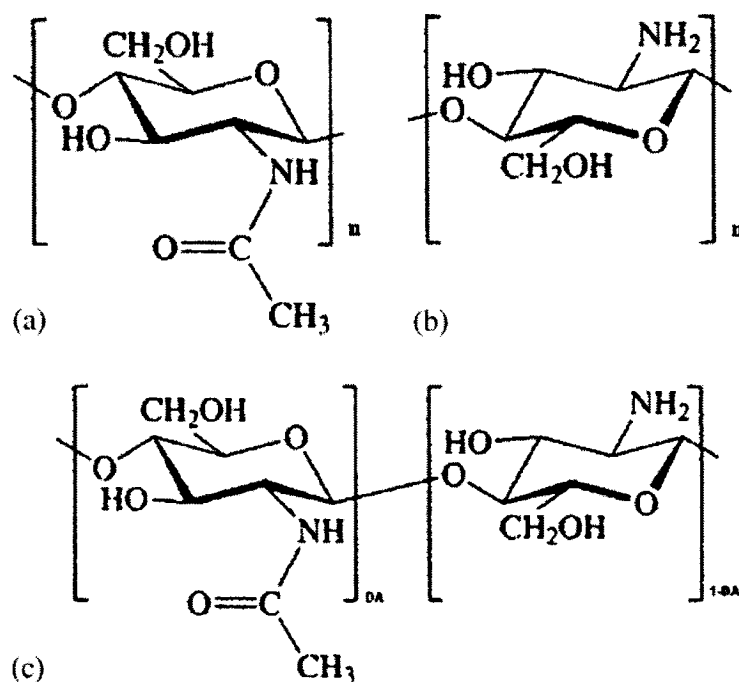


Figure 2.1. Structure de (a) la chitine et (b) du chitosane. (c) Structure d'un chitosane partiellement désacétylé (DA = degré d'acétylation). Image tirée de Rinaudo 2006.

2.2 Désacétylation de la chitine

2.2.1 Désacétylation hétérogène

Le chitosane est généralement préparé par une désacétylation alcaline (NaOH concentré) de la chitine à l'état solide. En raison du caractère semi-cristallin de la chitine, le chitosane obtenu par une réaction à l'état solide présente une distribution hétérogène (en bloc) des groupes acétyle sur la chaîne (Kurita, Sannan et al. 1977; Aiba

1991). Les bases du procédé de désacétylation sont établies dans deux brevets (E. I. du Pont de Nemours & Co. 1936; Rigby 1936). La désacétylation est influencée par la concentration du NaOH, par la température, par le temps de réaction ainsi que par la taille et la densité des particules de chitine (E. I. du Pont de Nemours & Co. 1936; Rigby 1936). Plus la concentration de NaOH est élevée, plus le temps de réaction et/ou la température requis sont réduits. Ainsi, un produit soluble dans l'acide peut être obtenu par des traitements de la chitine utilisant des combinaisons différentes de ces paramètres :

- 1) NaOH 5% w/w à 150°C pour 24 heures ou
- 2) NaOH 40% w/w à 100°C pour 18 heures ou
- 3) NaOH 50% w/w à 100°C pour 1 heure.

Une étude de Ottoy et al. (Ottoy, Varum et al. 1996) a montré que des chitosanes commerciaux désacétylés de façon hétérogène (NaOH 50% (w/v), ratio NaOH :chitine de 3.2 :1 et température de 75°C avec temps de réaction variable) étaient composés d'une fraction soluble et d'une fraction insoluble en milieu acide. Leurs résultats suggèrent que cette fraction insoluble est en fait composée de chitine qui n'a pas réagi. La proportion de fraction insoluble diminue avec le temps de la réaction et correspond à 3% du chitosane même après 10 heures de désacétylation. La désacétylation s'effectue de l'extérieur vers l'intérieur des particules de chitine et le centre de ces particules de chitine n'est pas désacétylé si le temps de la réaction n'est pas suffisant. Cette étude

montre l'importance d'utiliser de petites particules de chitine et/ou un temps de traitement suffisamment long pour obtenir un chitosane de composition homogène.

2.2.2 *Désacétylation homogène et réacétylation*

Il existe aussi des techniques de désacétylation de la chitine dites homogènes et qui produisent des chitosanes présentant une distribution homogène/aléatoire des groupes acétyle (Sannan, Kurita et al. 1975; Sannan, Kurita et al. 1976; Cho, Jang et al. 2000). Cho et al. ont procédé à la désacétylation de la chitine en préparant une suspension de chitine dans du NaOH 40% qui était ensuite dissoute en ajoutant de la glace broyée à 0°C et en agitant vigoureusement le mélange. Les concentrations finales de NaOH et de chitine étaient de 10% (w/w) et de 1% (w/w), respectivement. La solution dissoute était ensuite chauffée très lentement jusqu'à 25°C et agitée pour une période de temps variable selon le DDA visé. Ces traitements sont beaucoup moins sévères que la désacétylation hétérogène pour laquelle on utilise des concentrations de NaOH et des températures plus élevées ainsi que des temps de réaction plus courts. Une particularité des chitosanes obtenus avec cette méthode est qu'ils sont solubles en milieu acide à des DDA plus faibles (jusqu'à DDA ~ 30 % dans l'étude de Cho (Cho, Jang et al. 2000)) que ceux préparés par désacétylation hétérogène. De plus, les chitosanes homogènes sont solubles dans l'eau pour des valeurs de DDA de l'ordre de 50% alors que des chitosanes hétérogènes de DDA = 50% ne sont solubles qu'en milieu acide, voire insolubles. L'analyse par diffraction aux rayons X des chitosanes homogènes montre une décroissance marquée de la cristallinité qui pourrait expliquer la solubilité accrue de

ces chitosanes comparativement à ceux obtenus de façon hétérogène (Kurita, Sannan et al. 1977; Cho, Jang et al. 2000). Kurita et al. (Kurita, Sannan et al. 1977) ont observé que la cristallinité de chitosanes produits par désacétylation homogène diminuait beaucoup plus rapidement et que les chitosanes de DDA $> 40\%$ sont amorphes alors que des chitosanes hétérogènes présentent une certaine cristallinité jusqu'à des valeurs de DDA de 80%. Soulignons qu'il est aussi possible d'obtenir des chitosanes homogènes possédant des propriétés similaires à celles des chitosanes décrits plus haut en procédant à une réacétylation homogène de chitosanes fortement désacétylés (Aiba 1991).

2.3 Caractérisation du chitosane

2.3.1 Degré de désacétylation du chitosane

En raison de l'influence marquée du DDA sur les propriétés du chitosane, il est important de disposer d'une technique de mesure précise de ce paramètre. Une mesure précise du DDA est particulièrement importante pour la caractérisation acide-base du polymère pour laquelle la concentration de monomère glucosamine doit être connue avec précision. Plusieurs techniques ont été proposées pour la mesure du DDA : le titrage (Broussignac 1968), la spectroscopie infrarouge (IR) (Moore and Roberts 1980; Domszy and Roberts 1985; Baxter, Dillon et al. 1992; Sabnis and Block 1997), la spectroscopie UV (Muraki, Yaku et al. 1993; Tan, Khor et al. 1998), l'analyse élémentaire, le dichroïsme circulaire (CD) (Domard 1987), la spectroscopie RMN (Hirai, Odani et al. 1991; Varum, Anthonsen et al. 1991; Duarte, Ferreira et al. 2001) et

l'hydrolyse des groupes N-acetyl (Niola, Basora et al. 1993). Certaines de ces méthodes telles que le titrage potentiométrique et l'infrarouge peuvent être limitées en précision par le caractère fortement hygroscopique du chitosane. D'autres ne sont précises que sur certaines plages de valeurs du DDA (Balazs and Sipos 2007). Aussi, lorsque comparées, plusieurs méthodes donnent des résultats différents (Balazs and Sipos 2007). La RMN du proton est considérée comme étant la méthode la plus appropriée pour la mesure du DDA d'échantillons solubles (Rinaudo 2006).

2.3.2 *Distribution des groupements acétyle.*

Tel que mentionné plus haut (section 2.2.1), il a été suggéré que le chitosane désacétylé de façon hétérogène devrait présenter une distribution en bloc de groupements acétyle, i.e. une distribution non-aléatoire de ces groupements (Kurita, Sannan et al. 1977; Aiba 1991). Les conclusions de ces deux études étaient basées sur une caractérisation indirecte des chitosanes hétérogènes et homogènes (cristallinité, solubilité et gonflement de films de chitosane). Une méthode en RMN ^1H et ^{13}C basée sur un échantage dépendant de la séquence de monomères permet de déterminer les proportions des diades et des triades (séquences de 2 et 3 monomères, respectivement) (Varum, Anthonsen et al. 1991; Varum, Anthonsen et al. 1991). Les auteurs de ces études n'ont observé qu'un écart modeste entre les résultats attendus d'une distribution aléatoire et ceux obtenus pour un chitosane hétérogène préparé selon la méthode de Sannan et al. (Sannan, Kurita et al. 1976). Ils ont conclu que les chitosanes préparés dans des conditions hétérogènes présentaient une distribution aléatoire des monomères

glucosamine et N-acetyl-glucosamine (Varum, Anthonsen et al. 1991). Les auteurs de ces études soulignent que les chitosanes préparés de façon hétérogène à partir de chitine finement broyée ne sont peut-être pas directement comparables à des chitosanes commerciaux. Cependant, une autre étude (Brugnerotto, Desbrieres et al. 2001) a révélé une différence dans la distribution des diades et des triades dans des expériences de RMN ^{13}C entre des chitosanes préparés de façon hétérogène et homogène (préparé ici par réacétylation). Le spectre de RMN du chitosane hétérogène non dépolymérisé indiquait une distribution en bloc des groupements acétylés. Mentionnons que Sashiwa et al. (Sashiwa, Saimoto et al. 1991) ont procédé à l'analyse par GPC des oligomères générés par une dépolymérisation à l'acide nitreux de chitosanes préparés dans des conditions hétérogènes. Leurs résultats suggèrent une distribution aléatoire des groupes acétyle dans ces chitosanes.

2.3.3 *Mesure du poids moléculaire du chitosane*

La technique de référence pour la mesure de poids moléculaire est la chromatographie d'exclusion stérique sur gel couplée à un appareil de diffusion de lumière muni d'un détecteur « LALLS » (low-angle laser light scattering) ou « MALLS » (multiangle laser light scattering) (Rinaudo, Milas et al. 1993; Ottoy, Varum et al. 1996; Brugnerotto, Desbrieres et al. 2001). Elle permet d'obtenir le poids moléculaire moyen en nombre (M_n) ainsi que les autres moments de la distribution (M_w et M_z) et l'indice de polydispersité (M_w/M_n) qui rend compte de la dispersion de la distribution de poids moléculaire. L'utilisation d'un détecteur MALLS permet en plus de

déterminer directement la valeur du rayon de gyration (R_G) de la chaîne. Un des problèmes associé à la mesure du poids moléculaire est la tendance du chitosane à former des agrégats en solution (Anthonsen, Varum et al. 1994; Ottoy, Varum et al. 1996; Nystrom, Kjoniksen et al. 1999; Philippova, Volkov et al. 2001). Le choix du solvant est donc important afin de minimiser la formation d'agrégats qui interfèrent avec la mesure de poids moléculaire par diffusion de lumière. Rinaudo et al. (Rinaudo, Milas et al. 1993; Brugnerotto, Desbrieres et al. 2001) ont proposé que le solvant 0.3 M acétique/0.2 M sodium acétate (pH = 4.5) est un meilleur solvant que 0.1 M acide acétique/0.2 M NaCl, parce qu'il minimise le problème d'agrégation observé pour ce dernier. En utilisant un tampon d'acétate d'ammonium 0.2 M (pH = 4.5), Ottoy et al. (Ottoy, Varum et al. 1996) ont observé des distributions bimodales indiquant la présence d'agrégats pour des échantillons de concentration de chitosane supérieure à 1 mg/ml. Ils ont observé une tendance accrue à l'agrégation pour les chitosanes de f_D plus faibles. Bien que l'acétate d'ammonium soit reconnu pour interrompre les liens hydrogène, l'augmentation de la concentration d'ammonium n'a eu aucune influence sur la tendance à l'agrégation et les auteurs en concluent que celle-ci n'est pas causée par des liens hydrogène. Les auteurs suggèrent que la formation d'agrégats dans le solvant utilisé est le résultat d'interactions hydrophobiques entre les groupes acétyle.

2.4 Solubilité et Agrégation du Chitosane

2.4.1 Solubilité

La solubilisation du chitosane se fait par le biais de la protonation des groupes NH_2 et le polymère devient un polyélectrolyte cationique en solution (à l'exception des chitosanes de DDA $\sim 50\%$ préparés de façon homogène qui sont solubles dans l'eau (Sannan, Kurita et al. 1976; Aiba 1991). La solubilité est un paramètre difficile à contrôler : elle dépend du DDA, du pH, de la force ionique, de la nature de l'acide utilisé pour dissoudre le chitosane ainsi que de la distribution des groupes acétyle (Rinaudo 2006). Le chitosane est typiquement soluble en milieu acide seulement lorsque son degré d'ionisation (α) est suffisant pour que la force de répulsion électrostatique entre les double-couches prédomine sur les forces d'attraction (force de van der Waals, interactions hydrophobiques, ponts hydrogène) de façon à maintenir le polymère en solution. Ainsi, si le pH de la solution est augmenté (en ajoutant par exemple du NaOH) vers des valeurs avoisinant la neutralité (~ 6.5), on observe une précipitation du chitosane (Rinaudo 2006). Il est à noter que l'ajout d'une base faible telle que le glycerol-phosphate (GP) à une solution acide de chitosane permet d'augmenter le pH à des valeurs avoisinant la neutralité ($\sim 7-7.1$ à température de la pièce) sans pour autant faire précipiter le chitosane (Chenite, Chaput et al. 2000; Chenite, Buschmann et al. 2001).

Varum et al. ont démontré que la solubilité du chitosane diminue de façon appréciable avec l'augmentation de son DDA (Varum, Ottoy et al. 1994). Ils ont

quantifié la solubilité de chitosanes en fonction du pH en mesurant la masse de chitosane précipitée suite à l'ajout de quantités variables de NaOH. Soulignons que seul le chitosane préparé dans des conditions homogènes (DDA = 40%) était soluble à toutes les valeurs de pH testées (pH entre 4 et 9). Cette solubilité réduite pour les DDA élevés est observable aussi dans des expériences de titrage dans lesquelles les chitosanes de DDA élevés précipitent à des degrés d'ionisation du glucosamine (α) plus élevés (Domard 1987; Sorlier, Denuziere et al. 2001)

En procédant à une désacétylation homogène de la chitine, Aiba (Aiba 1991) a démontré que la distribution des groupes acétyl, en bloc ou aléatoire, est déterminante pour la solubilité du chitosane. La réacétylation, jusqu'à 51 % d'un chitosane hautement désacétylé en présence d'anhydride acétique résulte en un chitosane qui est soluble dans l'eau. Un produit obtenu de façon hétérogène avec le même DDA n'est soluble qu'en milieu acide (Aiba 1991). Cho et al. ont obtenu de la chitine de DDA $\sim$ 30% qui était soluble dans de l'acide acétique. Leur méthodologie pour la préparation du chitosane s'apparente à celle de Sannan (Sannan, Kurita et al. 1976).

2.4.2 Agrégation et hydrophobicité

Comme plusieurs polysaccharides, le chitosane a une tendance à s'associer et former des agrégats en solution. Anthonsen et al (Anthonsen, Varum et al. 1994) rapportent la présence d'aggrégats dans des solutions acides de chitosane détectés par diffusion de lumière. Toutefois, même à concentration de chitosane élevée, les agrégats ne

représentent qu'une faible fraction de la quantité totale du polymère. Les auteurs n'ont pu corréler l'importance de l'agrégation à la composition chimique des chitosanes. Tel que mentionné plus haut (section 2.3.3), Ottoy et al. (Ottoy, Varum et al. 1996) ont noté la présence d'agrégats dans des solutions de chitosane et une tendance à l'agrégation plus grande pour les chitosanes plus faiblement désacétylés. Une augmentation de la concentration de l'ammonium acétate, réputé éliminer les ponts hydrogène, n'a démontré aucun effet sur la tendance à s'agglomérer, ce qui implique, selon les auteurs, que des liaisons hydrogène ne sont pas impliquées dans cette agrégation. Ils ont aussi noté une plus grande quantité d'agrégats pour les chitosanes de poids moléculaire plus élevé. Rappelons qu'ils ont attribué cette agrégation aux interactions hydrophobiques entre les groupes acétyle.

Amiji (Amiji 1995) a étudié cette tendance à l'agrégation de deux chitosanes de DDA > 70% et de poids moléculaire de 70 et 750 kDa dans le HCl et l'acide acétique. Il a utilisé le pyrène dont le ratio des bandes de fluorescence I_1 et I_3 est un indicateur de la polarité du microenvironnement du pyrène (ce ratio décroît lorsque l'environnement du pyrène est hydrophobique). Il a noté une augmentation de l'hydrophobicité du microenvironnement du pyrène à des concentrations de chitosane supérieures à 1 mg/ml. Cette augmentation était plus marquée pour le chitosane de plus grand poids moléculaire et l'auteur a suggéré lui aussi que les chaînes s'associaient via des interactions hydrophobiques intermoléculaires entre les groupes acétyle. Philippova et al. (Philippova, Volkov et al. 2001) ont étudié la formation d'agrégats dans des solutions de

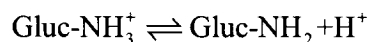
chitosane non-modifié (DDA=88) et de chitosane rendu hydrophobique (4% de monomères avec séquence n-dodécyl ($C_{12}H_{25}$)). Ils ont procédé à une analyse de viscosité et de la fluorescence du pyrène. Leurs résultats suggèrent que le chitosane non-modifié forme lui aussi des domaines hydrophobiques intermoléculaires, à des concentrations environ dix fois plus élevées que pour le chitosane modifié. Cependant, lorsque sont formés des domaines hydrophobiques, l'augmentation de la viscosité était moins élevée pour le chitosane non modifié et les auteurs expliquent ce résultat par la formation d'agrégats plus compacts avec le chitosane non modifié. Ils ont émis l'hypothèse que la formation d'agrégats pouvait être le résultat de formation de liens hydrogène entre le résidu acétyl et glucosamine. Cependant, l'ajout d'urée qui est réputée détruire les liens hydrogène et affaiblir les interactions hydrophobiques en agissant sur la propriété structurante de l'eau, n'influence aucunement la formation des agrégats pour le chitosane non modifié. Les auteurs en concluent que ce ne sont ni des liens hydrogène ni des interactions hydrophobiques du type que l'urée peut affaiblir qui sont à l'origine des agrégats. Notons que les auteurs ont observé que les domaines hydrophobiques dans les solutions de chitosane non-modifié n'étaient que très peu affectés par la chaleur.

Nyström et al. (Nystrom, Kjoniksen et al. 1999) ont étudié les propriétés de solutions de chitosane et de chitosane-hydrophobique (modifié avec ajout de C12-aldéhyde à divers degrés de substitution) par rhéologie et par diffusion de lumière. Ils ont observé une augmentation de la viscosité des solutions en fonction de la concentration plus

importante pour les chitosanes rendus hydrophobiques. Les expériences en diffusion de lumière ont révélé que le phénomène d'association intermoléculaire était augmenté lors d'une diminution de la température et une augmentation de la concentration de polymère et de l'hydrophobicité.

2.5 Propriétés acide-base du chitosane

Tel que mentionné plus haut, lorsque le chitosane est un polyélectrolyte et lorsque dissout en milieu aqueux, l'équilibre acide-base suivant s'établit :



Cet équilibre de dissociation peut être décrit par la constante de dissociation

$$\text{p}K_a = \text{pH} + \log\left(\frac{\alpha}{1-\alpha}\right)$$

Eq 2.1

où α est le degré d'ionisation du chitosane, c'est-à-dire la fraction de monomères glucosamine ionisés. Cependant, pour un polyélectrolyte, le $\text{p}K_a$ n'est pas constant puisque l'augmentation de l'état de charge rend plus difficile l'ajout de protons à la chaîne ce qui se traduit par une diminution du $\text{p}K_a$ lorsque α augmente. Ainsi, on utilise

le pK_a apparent, i.e. pK_{ap} , pour décrire un polyélectrolyte. Une valeur souvent rapportée dans la littérature est le pK_a intrinsèque ou pK_0 du chitosane. Cette quantité représente la valeur du pK_a du polymère lorsque celui-ci est neutre ($\alpha = 0$), lorsque la contribution électrostatique est nulle. Puisque le chitosane est généralement insoluble lorsque complètement neutralisé, la valeur du pK_0 est obtenue par une extrapolation à $\alpha = 0$ d'une courbe pK_{ap} vs α . La différence entre le pK_{ap} et le pK_0 ($\Delta pK_{ap} = pK_{ap} - pK_0$) représente la correction à la constante de dissociation résultant des interactions électrostatiques. Cette différence est directement liée à l'excès d'énergie libre du polyélectrolyte par rapport à un monoacide (Ullner 2002) :

$$pK_{ap} = pK_0 - \frac{1}{NkT \ln 10} \frac{\partial F^{ex}}{\partial \alpha}$$

Eq 2.2

où k est la constante de Boltzmann, T est la température et N est le nombre de sites ionisables de la chaîne.

Une large gamme de valeurs allant de 6.0 à 9.0 sont rapportées dans la littérature pour le pK_0 du chitosane (Tsukada and Inoue 1981; Domard 1987; Anthonsen and Smidsrod 1995; Rinaudo, Pavlov et al. 1999; Sorlier, Denuziere et al. 2001; Strand, Tommeraas et al. 2001). En procédant au titrage d'oligomères de longueur croissante, Tsukada et al.

(Tsukada and Inoue 1981) ont trouvé une valeur de 6.74 pour le pK_0 . L'avantage de leur technique réside dans l'utilisation de monomères qui sont solubles sur toute la plage de valeurs de α . Ainsi, plutôt que de procéder à une extrapolation d'une courbe de pK_{ap} vs α , ils ont déterminé la valeur de pK_0 du chitosane en extrapolant la courbe pK_0^{oligo} vs $1/n$ (où n est la longueur de l'oligomère). Les deux études rapportant des pK_0 de l'ordre de 9 (Anthonsen and Smidsrod 1995; Strand, Tommeraas et al. 2001) ne sont pas compatibles avec les valeurs de nombreuses autres études (Tsukada and Inoue 1981; Domard 1987; Rinaudo, Pavlov et al. 1999; Rinaudo, Pavlov et al. 1999; Sorlier, Denuziere et al. 2001), apparemment en raison d'une erreur dans l'équation du pK_{ap} que les auteurs ont utilisé :

$$pK_{ap} = pH - \log\left(\frac{\alpha}{1-\alpha}\right) \quad (\text{Anthonsen and Smidsrod 1995; Strand, Tommeraas et al. 2001})$$

ou $pK_{ap} = pH + \log\left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right)$ (Strand, Tommeraas et al. 2001) alors que

$$pK_{ap} = pH + \log\left(\frac{\alpha}{1-\alpha}\right), \text{ où } \alpha \text{ est la fraction de monomères glucosamine ionisés sur la chaîne.}$$

Deux études (Rinaudo, Pavlov et al. 1999; Rinaudo, Pavlov et al. 1999) rapportent des valeurs de pK_0 de 6.0 dans l'acide acétique et dans l'acide chlorhydrique. Ces valeurs semblent faibles et pourraient être inexactes en raison de l'utilisation de mesures de pH effectuées à faible valeurs de α pour lesquelles le chitosane n'est que partiellement soluble. Des études de Sorlier (Sorlier, Denuziere et al. 2001) et Domard (Domard 1987) rapportent toutes deux des valeurs de 6.5. Il est à noter que dans les études citées ci-dessus, aucune des extrapolations effectuées dans le but de déterminer la

valeur de pK_0 n'était basée sur l'application d'un modèle théorique. La force ionique influence la valeur du pK_{ap} en modulant la contribution électrostatique au pK_a apparent. Sorlier (Sorlier, Denuziere et al. 2001) a observé une augmentation du pK_{ap} avec l'augmentation de la force ionique, résultat qui est en accord avec un écrantage électrostatique accru en présence d'une concentration plus importante d'ions mobiles. Il semble qu'aucun modèle microscopique n'ait été proposé dans la littérature pour décrire le comportement acide-base du chitosane.

2.5.1 *Titration de polyélectrolytes*

Il existe trois méthodes de base pour le calcul théorique de courbes de titrage (Ullner 2002) : 1) Une approche dite du champ moyen tient compte des interactions de longue portée que sont les interactions électrostatiques mais néglige les corrélations possibles entre les sites. Le modèle de la cellule cylindrique basé sur l'application de l'équation de Poisson-Boltzmann (Marcus 1955; Alexandrowicz and Katchalsky 1963) est un exemple de modèle du champ moyen; 2) Un modèle d'Ising qui n'inclut que les interactions de courte portée, mais qui tient compte des interactions entre voisins proches (Smits, Koper et al. 1993); 3) La simulation Monte Carlo (Nishio 1994; Ullner, Joensson et al. 1996) tient compte à la fois des interactions de longue portée et des corrélations et peut inclure des interactions d'attraction entre monomères pour simuler une chaîne hydrophobe. Cette méthode ne sera pas discutée plus en détail ici.

Dans l'approximation du champ moyen, la variation du pK_a devient (Marcus 1955; Ullner 2002)

$$\Delta pK_{ap} = -\frac{e\psi(\alpha)}{kT \ln 10}$$

Eq 2.3

où e est la charge élémentaire, $\psi(\alpha)$ est le potentiel moyenné sur les sites impliqués dans l'équilibre de dissociation.

Dans un modèle où la charge totale est répartie uniformément sur la surface d'une sphère ou d'un cylindre, le calcul de ΔpK_{ap} revient à calculer le potentiel à la surface du polyélectrolyte pour différentes valeurs de α . Ce potentiel est en général calculé en trouvant la solution de l'équation de Poisson-Boltzmann (linéarisée ou non) avec les conditions aux frontières appropriées. Ce modèle néglige les corrélations entre les ions ainsi que les changements possibles de conformation. Kotin et Nagasawa (Kotin and Nagasawa 1962) ont été les premiers à utiliser l'équation de Poisson-Boltzmann non-linéaire pour le titrage de polyélectrolytes. Les modèles à géométrie cylindrique reproduisent les données de titrage expérimentales relativement bien, mais il n'est pas rare que la valeur du rayon du cylindre utilisée pour bien prédire les résultats expérimentaux soit supérieure à la valeur obtenue par d'autres méthodes (Ullner 2002).

Par exemple, Cleland et al (Cleland, Wang et al. 1982), ont trouvé une valeur de 1 nm pour l'acide hyaluronique comparativement à la valeur structurale attendue de l'ordre de 0.3 à 0.7 nm.

Les modèles utilisant l'approche du champ moyen décrivent moins bien les polyélectrolytes dont les sites chargés sont plus rapprochés, tels que le polyéthylèneimine linéaire (Smits, Koper et al. 1993). Pour de tels polyélectrolytes, la courbe de titrage présente un changement important du pK_a avec α avec un point d'inflexion autour de $\alpha = 0.5$. Ce changement important autour de $\alpha = 0.5$ suggère qu'il existe une forte corrélation entre voisins tel que tous les sites deviennent chargés avant que des paires de sites chargés soient formées entre voisins proches. Des modèles basés sur le modèle d'Ising tenant compte des corrélations entre voisins proches sont souvent utilisés pour modéliser ce type de polyélectrolyte.

2.6 Dépolymérisation et dégradabilité du chitosane

2.6.1 Dépolymérisation

Il existe un intérêt marqué pour la dépolymérisation du chitosane, entre autre pour les applications de livraison de gènes pour lesquelles les études tendent à démontrer que des chitosanes de faible poids moléculaire sont plus efficaces (Koping-Hoggard, Mel'nikova et al. 2003; Koping-Hoggard, Varum et al. 2004). Plusieurs techniques ont été utilisées pour dépolymériser ou dégrader le chitosane : la dépolymérisation aux ultrasons (Tang,

Huang et al. 2003), à la chaleur (autoclave) (No, Nah et al. 2003), à l'acide (HCl) avec agitation mécanique (Rege and Block 1999; Sabnis and Block 2000), au peroxyde d'hydrogène (Nordtveit, Varum et al. 1994), les méthodes enzymatiques spécifiques (chitosanase) (Cheng and Li 2000) ou non spécifiques (Kittur, Kumar et al. 2003; Li, Du et al. 2007) et la dépolymérisation à l'acide nitreux (HONO) (Anthonsen, Varum et al. 1993; Allan and Peyron 1995; Allan and Peyron 1995; Brugnerotto, Desbrieres et al. 2001; Tommeraas, Varum et al. 2001; Janes and Alonso 2003). La technique la plus utilisée est la dépolymérisation à l'acide nitreux. C'est une méthode sélective, rapide, facile à contrôler en plus d'être peu coûteuse (Allan and Peyron 1995). Le HONO attaque les groupes amine seulement et clive ensuite le lien glycosidique. Selon Allan et Peyron (Allan and Peyron 1995), la stoechiométrie de la réaction est bien établie, une mole de HONO étant consommée par mole de groupes amines ayant réagi. Un monomère de 2,5-anhydro-D-mannose se forme à l'extrémité réductrice du polymère clivé. Même si plusieurs produits de désamination sont souvent observés avec les carbohydrates aminés, aucune réaction secondaire n'est rapportée pour le chitosane (Sashiwa, Saimoto et al. 1993). Dans un deuxième article, Allen et Peyron (Allan and Peyron 1995) ont développé une expression simple pour prédire le degré de polymérisation du chitosane en fonction du ratio HONO/chitosane, après réaction complète avec l'acide nitreux. Cette expression est basée sur une stœchiométrie 1 :1, i.e. une mole de HONO consommée par mole de liens glycosidiques clivés. Tomemeraas et al. (Tommeraas, Varum et al. 2001) parlent plutôt d'une réaction entre le HONO et le chitosane qui est approximativement stœchiométrique.

2.6.2 Dégradabilité du chitosane

Le chitosane est dégradé par le lysozyme (Amano and Ito 1978) qui hydrolyse le lien glycosidique β (1 $\rightarrow$ 4) de la chitine et du chitosane. Cette dégradabilité constitue une propriété importante du chitosane pour de potentielles applications thérapeutiques. La fraction ainsi que la distribution des monomères N-acétyl modulent fortement la biodégradabilité du polysaccharide. Des oligomères complètement acétylés sont hydrolysés beaucoup plus efficacement que des oligomères moins acétylés alors que des oligomères complètement désacétylés ne sont pas dégradés par le lysozyme (Amano and Ito 1978). Aiba (Aiba 1992) a observé que des chitosanes hétérogènes étaient environ quatre fois plus digestibles au début de la réaction que des chitosanes préparés dans des conditions homogènes (réacétylation). Aiba (Aiba 1992) propose que le lysozyme agit sur des séquences comprenant au moins trois monomères N-acetyl-glucosamine consécutifs, ce qui explique la différence observée entre les chitosanes homogènes et hétérogènes au début de la réaction. Varum et al (Varum, Myhr et al. 1997) ont observé que la dégradabilité du chitosane dans du sérum humain varie fortement avec le DDA. Ils ont déterminé que le taux de dégradation initial du chitosane dans du sérum humain est proportionnel à $(1-f_D)^{4.5}$. En augmentant la concentration de lysozyme ajouté au mélange de chitosane et de sérum humain, ils ont noté une augmentation relative avec f_D qui était équivalente dans tous les cas. Ce résultat suggère que le chitosane est principalement dépolymérisé par le lysozyme dans le sérum humain et non par d'autres enzymes ou autres mécanismes de dépolymérisation. Dans une autre étude, Varum et al. (Varum, Holme et al. 1996) ont déterminé que le lysozyme hydrolyse de façon

préférentielle seulement deux des 16 combinaisons possibles pour une séquence de quatre monomères, soit les séquences A-A-A-A et A-A-A-D et ils ont établi que la séquence était préférentiellement clivée en son centre. C'est cette spécificité du lysozyme qui explique la forte dépendance du taux de dégradation sur le DDA.

2.7 Gels à base de chitosane

Il existe plusieurs hydrogels à base de chitosane, certains étant réticulés chimiquement (Draget 1996; Yamamoto and Amaike 1997) et d'autres consistant en des gels physiques. Parmi ces gels physiques, certains sont induits simplement par une augmentation de la concentration en chitosane (Delben, Lapasin et al. 1990; Iversen, Kjoniksen et al. 1997, Nystrom, Kjoniksen et al. 1999). Soulignons aussi le cas de solutions de chitosanes modifiés avec des alkyls qui lorsque chauffées présentent des caractéristiques similaires à celle d'un gel (Desbrieres, Martinez et al. 1996).

Récemment, un gel physique thermosensible à base de chitosane et de glycérol phosphate, ayant la particularité de geler lorsque chauffé, a été découvert (Chenite, Chaput et al. 2000). Ce gel a ensuite fait l'objet de deux études visant à mieux comprendre son mécanisme (Chenite, Buschmann et al. 2001; Cho, Heuzey et al. 2005). Ces études ont suggéré que le mécanisme de thermogélification du système chitosane/GP était principalement le résultat d'un renforcement des interactions hydrophobiques lors de l'augmentation de la température. Chenite et al ont proposé que le groupe glycérol du GP avait un effet structurant sur l'eau et que cet effet était

responsable du renforcement avec le chauffage des interactions hydrophobiques chitosane-chitosane (Chenite, Buschmann et al. 2001). Les auteurs de la deuxième étude ont proposé une augmentation moins spécifique de l'hydrophobicité avec l'augmentation de la température invoquant, pour justifier cette hypothèse, les travaux de (Desbrières, Martinez et al. 1996). Tel que mentionné plus haut, Desbrières et al. ont observé une gélification induite par chauffage de solutions de chitosane rendu hydrophobique par ajout de groupes alkyl. Soulignons que les interactions hydrophobiques entre des petits groupes apolaires dans l'eau sont intensifiées avec l'augmentation de la température, mais que cette dépendance en température diffère significativement pour des structures de plus grande taille comme les macromolécules ou les surfaces (Lum, Chandler et al. 1999, Huang and Chandler 2000).

2.8 Livraison de gènes avec le chitosane

L'objectif principal de la livraison de gènes est le développement de véhicules de livraison efficaces, non-toxiques qui soient en mesure d'encapsuler et de livrer *in vivo* du matériel génétique thérapeutique dans des cellules spécifiques. Il existe deux types de vecteurs pour la livraison de gènes, soit les vecteurs viraux et les vecteurs non-viraux. Les vecteurs viraux sont dérivés de virus qui ont évolué naturellement et sont donc très efficaces pour transférer du matériel génétique dans des cellules hôtes. Par contre, la taille du matériel génétique qui peut être incorporé à ces vecteurs est limitée. De plus, ces vecteurs peuvent induire des effets oncogènes (rétrovirus) ainsi que des réponses immunologiques (Somia and Verma 2000; Ferber 2001). Ces inconvénients associés aux

virus ont stimulé la recherche sur les systèmes non-viraux. Les véhicules non-viraux sont généralement cationiques et ce type de vecteurs comprend les polymères cationiques, les peptides cationiques et les liposomes cationiques. Actuellement, le principal problème des systèmes non-viraux réside dans leur efficacité de transfection relativement faible.

Même si les virus et les polymères synthétiques sont les véhicules plus utilisés pour la livraison de gènes, les polymères naturels présentent des propriétés intrinsèques qui motivent leur utilisation pour la livraison de gènes (Dang and Leong 2006). Les polymères naturels sont généralement non-toxiques, mucoadhésifs, biocompatibles et biodégradables (Ratner and Bryant 2004). Le chitosane est l'un des polymères cationiques naturels les plus utilisés pour la livraison de gènes (MacLaughlin, Mumper et al. 1998; Richardson, Kolbe et al. 1999; Borchard 2001; Cui and Mumper 2001; Ishii, Okahata et al. 2001; Koping-Hoggard, Tubulekas et al. 2001; Mao, Roy et al. 2001; Sato, Ishii et al. 2001; Liu and De Yao 2002; Chew, Wolfowicz et al. 2003; Corsi, Chellat et al. 2003; Iqbal, Lin et al. 2003; Koping-Hoggard, Mel'nikova et al. 2003; Romoren, Pedersen et al. 2003; Bozkir and Saka 2004; Bozkir and Saka 2004; Koping-Hoggard, Varum et al. 2004; Vila, Sanchez et al. 2004, Leong, Mao et al. 1998; Roy 1999; Roy, Mitra et al. 2003, Huang, Fong et al. 2005). Le chitosane qui est de charge opposée à l'ADN interagit fortement avec celui-ci et le condense en formant des nanoparticules qui protègent l'ADN des nucléases qui peuvent rapidement dégrader l'ADN (Liu and De Yao 2002). Le chitosane est généralement utilisé en excès de telle

sorte que les nanoparticules ont une charge nette positive qui favorise l'interaction non-spécifique avec la membrane plasmique des cellules. Le chitosane est biocompatible, biodégradable, non-toxique et des complexes chitosane/pDNA peuvent être préparés à faible coût. Il n'y a pratiquement pas de limite en ce qui a trait aux types de molécules qui peuvent être incorporées ou conjuguées aux complexes de chitosane-ADN (Dang and Leong 2006)

En raison de leur caractère mucoadhésif, des complexes chitosane/ADN administrés par voie orale (Roy, Mao et al. 1999; Chew, Wolfowicz et al. 2003, Kumar, Kong et al. 2003; Kai and Ochiya 2004) ou nasale (Iqbal, Lin et al. 2003; Vila, Sanchez et al. 2004; Xu, Shen et al. 2004) ont mené à une immunisation par ADN. Par exemple, Roy et al. ont montré que la livraison par voie orale de complexes chitosane/ADN codant pour Arah2 (l'antigène dominant provoquant la réaction anaphylactique dans l'allergie aux arachides) réduit considérablement la réaction anaphylactique dans un test de provocation chez des souris rendues hypersensibles (Roy, Mao et al. 1999).

2.8.1 Mécanisme de transfection

Pour parvenir à transfecter des cellules avec de l'ADN plasmide (pDNA), plusieurs obstacles doivent être surmontés. Les étapes de la transfection d'une livraison locale sont schématisées à la **Figure 2.2**. Le chitosane est généralement utilisé en excès de telle sorte que les nanoparticules ont une charge nette positive qui favorise l'interaction non-spécifique avec la membrane plasmique des cellules. Des ligands peuvent aussi être

greffés aux complexes afin de leur conférer une certaine spécificité (Mao, Roy et al. 2001; Kim, Park et al. 2004). En absence de ligand, il semble que le chitosane soit internalisé par macropynocytose (Huang, Ma et al. 2002).

Une fois internalisés, les complexes se retrouvent dans l'endosome et sont ensuite dégradés dans les lysosomes si aucun mécanisme pour s'échapper de ces vésicules n'existe. En comparant la cinétique d'expression et en observant l'évolution de la structure de l'endosome dans des cellules transfectées avec le polyéthylèneimine (PEI) et le chitosane, Köping-Höggard et al. (Koping-Hoggard, Tubulekas et al. 2001) ont conclu que le mécanisme par lequel le chitosane s'échappe de l'endosome n'est pas celui du « proton sponge » qui est proposé pour le PEI (Boussif, Lezoualch et al. 1995; Behr 1997). Les auteurs suggèrent plutôt que c'est l'augmentation de l'osmolarité de l'endosome par les produits de la dégradation enzymatique du chitosane (oligo- et monosaccharides) qui mène au gonflement et à la rupture subséquente de l'endosome. Même si c'est une stratégie qui à notre connaissance n'a pas été utilisée avec le chitosane, il est possible d'incorporer des peptides endosomolytiques à des polyplexes afin de faciliter la rupture de l'endosome (Zhong, Wu et al. 2001; Shir, Ogris et al. 2006).

Après avoir échappé à la dégradation dans le lysosome, les complexes se retrouvent dans le cytoplasme et sont transportés vers le noyau. Des cellules en division sont plus facilement transfectées que des cellules quiescentes en raison de la disparition de la

membrane nucléaire à la mitose (Brunner, Sauer et al. 2000). L'ADN plasmide ne diffuse pas dans le cytoplasme des cellules quiescentes (Escriou, Carriere et al. 2003) et il est suggéré qu'il doit être condensé par le polymère cationique pour être dirigé vers une internalisation nucléaire via le « nuclear pore complex » (NPC) (Pouton and Seymour 2001). L'internalisation nucléaire physiologique de protéines cytoplasmiques par le NPC est dépendante de la présence de séquence de localisation nucléaire (NLS) qui sont relativement cationiques et qui interagissent avec une série de protéines cytoplasmiques afin d'ouvrir le NPC (Pouton 1998). Ces séquences peuvent être couplées à l'ADN plasmide pour améliorer son internalisation nucléaire (Neves, Scherman et al. 2001; Escriou, Carriere et al. 2003). Une fois dans le noyau le plasmide peut se dissocier du polycation, mais il a été démontré que la présence du polycation n'inhibe pas nécessairement la transcription (Bieber, Meissner et al. 2002).

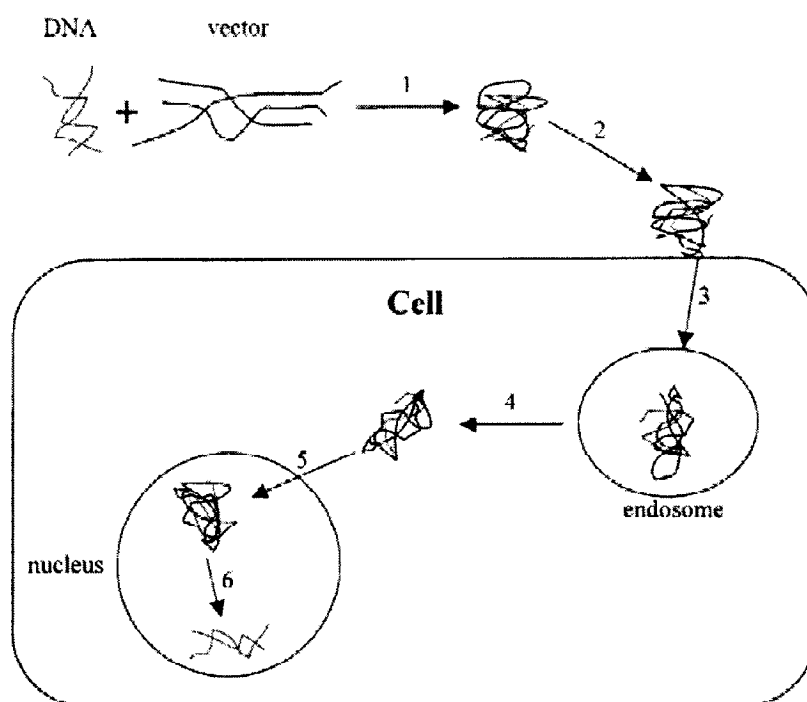


Figure 2.2. Étapes de la transfection non-virale : 1) formation du complexe vecteur/ADN, le plasmide est condensé par un vecteur cationique approprié 2) le complexe se lie à la cellule par interaction spécifique ou non-spécifique 3) internalisation des complexes dans l'endosome 4) le complexe s'échappe de l'endosome et se retourne dans le cytoplasme 5) transport intracellulaire et internalisation de l'ADN dans le noyau 6) décomplexation. Image tirée de Borchard 2001.

2.8.2 Influence de la structure du chitosane

Afin d'améliorer l'efficacité de transfection du chitosane, plusieurs études rapportent l'utilisation de chitosanes de faible poids moléculaire (Erbacher, Zou et al. 1998; Lee, Kwon et al. 1998; MacLaughlin, Mumper et al. 1998; Richardson, Kolbe et al. 1999;

Koping-Hoggard, Tubulekas et al. 2001; Lee, Nah et al. 2001; Sato, Ishii et al. 2001; Park, Kim et al. 2003; Romoren, Pedersen et al. 2003; Thomas and Klibanov 2003) et d'oligomères (Thanou, Florea et al. 2002; Koping-Hoggard, Varum et al. 2004). Afin d'obtenir des niveaux de transfection élevés, on suggère qu'il doit exister un équilibre entre la protection de l'ADN (meilleure pour MW élevé) et l'efficacité de la dissociation intracellulaire des composantes des polyplexes (facilitée pour MW faible) (Koping-Hoggard, Varum et al. 2004). Une étude de Strand et al. montre que les propriétés de complexes chitosane/ADN dépendent fortement du DDA et du poids moléculaire du chitosane (Strand, Danielsen et al. 2005). Ils suggèrent que des polycations trop courts sont susceptibles de se dissocier trop facilement pour protéger adéquatement l'ADN alors que de longues chaînes peuvent former des complexes très stables avec une capacité limitée à libérer l'ADN. En plus des caractéristiques propres au chitosane, les auteurs soulignent que les conditions de formulations telles que le pH, le ratio chitosane :ADN (N:P), la force ionique et le protocole de transfection influencent aussi l'affinité du chitosane pour l'ADN et le comportement de dissociation des complexes chitosane/ADN.

CHAPITRE 3: ARTICLE - A VALIDATED ^1H NMR METHOD FOR THE DETERMINATION OF THE DEGREE OF DEACETYLATION OF CHITOSAN

3.1 Abstract

A method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan by ^1H NMR spectroscopy has been formally validated. Chitosans with degree of deacetylation (DDA) ranging from 48% to 100% have been used for the validation. The method is found to be simple, rapid and more precise than other known techniques like IR or titration for %DDA measurements. The precision, ruggedness, robustness, specificity, stability and accuracy of the technique are discussed in this paper.

KEYWORDS: Chitosan; Chitin; pH-sensitive; IR, ^1H NMR, Degree of deacetylation

3.2 Introduction

Chitosan is a natural polysaccharide obtained by partial deacetylation of chitin and is used in many industries such as food processing, cosmetics, waste management, water clarification, wound healing, tissue repair, drug and gene delivery. Most of the physical and chemical properties of this biopolymer depend greatly on the degree of deacetylation (DDA) and it has been repeatedly claimed in the literature that a technique to measure this parameter accurately is highly desirable. Such a technique should be fast, precise and should preferably not rely on any standard of known DDA or calibration curve obtained with another technique. Several methods have been proposed for measuring the DDA of chitosan including: titration (Terayama 1952; Broussignac 1968), IR spectroscopy (Sannan, Kurita et al. 1978; Miya, Iwamoto et al. 1980; Moore and Roberts 1980; Domszy and Roberts 1985; Sabnis and Block 1997), UV spectroscopy (Muraki, Yaku et al. 1993; Tan, Khor et al. 1998), elemental analysis, circular dichroism (CD) (Domard 1987), NMR spectroscopy (Hirai, Odani et al. 1991; Varum, Anthonsen et al. 1991; Raymond, Morin et al. 1993; Duarte, Ferreira et al. 2001), N-acetyl group hydrolysis (Niola, Basora et al. 1993) and gel permeation chromatography (GPC) (Aiba 1986). Unfortunately, these techniques often show considerable discrepancies in the obtained DDA values.

IR is probably the most studied technique for DDA measurement. The method is quite fast and it can be used with insoluble chitosan via the KBr disc technique (Domszy and Roberts 1985; Shigemasa, Matsuura et al. 1996; Sabnis and Block 1997). Over the

past two decades, many authors have proposed improvements in the IR methods making use of new absorption bands and/or a new baseline for the measurement of DDA (Miya, Iwamoto et al. 1980; Moore and Roberts 1980; Baxter, Dillon et al. 1992; Shigemasa, Matsuura et al. 1996; Sabnis and Block 1997). Other methods, when published are often compared with IR (Domard and Rinaudo 1983; Aiba 1986; Domard 1987; Muraki, Yaku et al. 1993). One issue with optical spectroscopic techniques like IR is the requirement of standards of known DDA or the use of a calibration curve obtained using another method, such as titration, which in itself is not necessarily accurate. Use of the amide I absorption band (1655 cm^{-1}) combined with the hydroxyl absorption band (3450 cm^{-1}) as a reference appears to provide the best results. Empirical equations to calculate chitosan DDA using these two bands with different baselines have been proposed (Domszy and Roberts 1985; Baxter, Dillon et al. 1992). However, as pointed out by Sabnis et al. (Sabnis and Block 1997), variability in sample preparation, type of instrument and experimental conditions could influence the results obtained using these equations. Sabnis et al. (Sabnis and Block 1997) obtained accurate results by using the method proposed by Baxter et al. (Baxter, Dillon et al. 1992) but they used a calibration curve obtained by titration of hydrobromide salts of chitosan. Chitosan is very hygroscopic and it must be carefully dried to eliminate moisture that could contribute to the hydroxyl band intensity and lead to incorrect DDA determination.

All techniques, except for NMR based measurements, require an accurate weighing of chitosan. Therefore, moisture needs to be eliminated carefully and the

purity of the samples must be determined separately. Also, many of these non-NMR techniques are inaccurate, long or complicated to perform. In the ^1H NMR method, the amount of chitosan used does not need to be known accurately and the purity of the sample does not need to be determined as long as the impurity peaks do not overlap with the relevant peaks of chitosan. Sample preparation is simple, only a few milligrams of chitosan are required and there is no need for any calibration curve or reference sample of known DDA. The peaks used for DDA determination in this method are well resolved and the integration of these peaks is straightforward. Contrary to the claims of Domard et al. (Domard and Rinaudo 1983), ^1H NMR has been found to be precise and accurate for the quantification of high degrees of deacetylation, which is usually difficult to measure with conventional techniques like IR or titration. Additionally DDA can be calculated using different combinations of peaks in order to verify that the method is consistent. The liquid phase ^1H NMR technique described in this paper is only limited by the solubility of chitosan which depends on the DDA and the molecular weight of the polymer. This paper describes the validation of the measurement of the degree of deacetylation of chitosan by liquid phase ^1H NMR.

3.3 Experimental

3.3.1 Materials

Chitosans with DDA ranging from 48% to 100% in powder form were prepared at Bio Syntech Canada Inc. (Montreal). Six different lots of chitosan were used in this

study: PCCH00014 (DDA ~ 100%), PCCH00013 (DDA ~ 97%), PCCH00005 (DDA ~ 87%), PCCH00002 (DDA ~ 82%), PCCH00003 (DDA ~ 76%) and PCCH00024 (DDA ~ 48%). Deuterium oxide (Cat # 15,188-2), deuterium chloride 20% wt/vol in deuterium oxide (Cat # 17-672-9) and glacial acetic acid (Cat # 33,882-6) were purchased from Aldrich Chemical.

3.3.2 *Samples*

For all tests except for accuracy, the solutions of chitosan were prepared by stirring at room temperature 10 mg of chitosan in a solution composed of 1.96 ml of D₂O and 0.04 ml of DCl and waiting about half an hour to ensure complete dissolution of the polymer. In these solutions, DCl is in excess compared to amino groups of chitosan so that the polymer is easily dissolved. For the accuracy test, solutions of chitosans of lowest and highest DDA (PCCH00024 and PCCH00014, respectively) were used. They were prepared by stirring at room temperature 30 mg of dried chitosan in a solution composed of 4.9 ml of D₂O and 0.1 ml of DCl. Test solutions were prepared by mixing these two solutions in three different volumetric ratios: 80:20, 50:50 and 20:80. For this test only, the chitosan powders were thoroughly dried to ensure accurate calculation of the expected DDA of the three mixed samples.

NMR-¹H NMR spectra were acquired on a Varian Mercury 400 MHz spectrometer equipped with a 16 bits digitizer using a Varian 5 mm Indirect Detection probe. The experiments were run at 70°C, temperature at which the solvent (HOD) peak does not

interfere with any of chitosan's peaks. After dissolution, approximately 1 ml of the chitosan solution was transferred to a 5 mm NMR tube. The sample tube was inserted in the magnet and allowed to reach thermal equilibrium by waiting 10 minutes before performing the experiment. The ^1H NMR experiment for DDA determination was a single pulse sequence with presaturation of the solvent. A 90° pulse corresponding to a pulse width of 11 μs was used. The delay before the application of the pulse was 6 seconds and the acquisition time was 2 seconds for a total relaxation time (recycle time) of 8 seconds between each transient. Longitudinal relaxation times (T_1 's) of protons of chitosans PCCH00024 (DDA $\sim 48\%$) and PCCH00014 (DDA $\sim 100\%$) were measured by using the inversion recovery pulse sequence (180° - τ - 90°). The T_1 's of chitosan protons were all found to be lower than 1.6 second ($5 \times T_1 < 8$ seconds) so that relaxation was complete before each pulse application in the DDA determination experiment. The hydrolytic cleavage of the acetyl groups of chitosan by dilute acid at 70°C was found to be quite slow and therefore, it was not necessary to use a large relaxation delay in order to quantify the amount of acetic acid resulting of deacetylation as proposed by Hirai et al. (Hirai, Odani et al. 1991) who used a relaxation time of 40 seconds for the determination of DDA. Solvent signal suppression was achieved by saturation with irradiation from the decoupler set to the solvent resonance frequency using low power during the 6 second delay before the 90° pulse application. The decoupler was turned off just prior to the 90° pulse and during the entire 2 second signal acquisition period. The decoupler power was 1 dB (~ 0.03 mW according to Varian specifications). The spectral width was 4550 Hz, the number of data points was 18200, the line broadening parameter

was 1 Hz and the Fourier number was 32768. The number of acquired transients was 64 corresponding to approximately 8.5 minutes of signal acquisition. The total time for acquisition of the data, including thermal equilibration time (10 minutes after reaching 70°C) and time required to shim the magnet (5 minutes), was about 25 minutes. Prior to signal integration, a linear drift correction was applied between 1 and 6 ppm. There were no predefined boundaries for integration of the peaks. Integration boundaries were set manually by inspection of the spectrum, based on the analyst's judgment. Manual adjustment of integration boundaries was necessary since peak intensities and therefore integration boundaries change with DDA. No measurable inaccuracy was introduced by this manual setting since different analysts achieved very similar results (see Ruggedness test below). All spectra were obtained in triplicate and the coefficients of variation (CV) of the results were calculated using:

$$CV = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^3 [\overline{DDA} - DDA_i]^2}{(3-1)}}}{\overline{DDA}}^a$$

3.4 Results and Discussion

The structures of acetylated and deacetylated monomers of chitosan are presented in **Figure 3.1**. **Figure 3.2** presents the 400 MHz ¹H NMR spectrum of

^a C'est cette équation qui a été utilisée pour les calculs malgré une erreur dans l'expression du CV dans la version publiée.

chitosan PCCH00005 (DDA ~ 87%) at 70°C. The solvent (HOD) proton resonates at 4.67 ppm. The assignment of chitosan peaks have already been reported in the literature (Hirai, Odani et al. 1991; Varum, Anthonsen et al. 1991). **Tableau 3.1** shows the chemical shifts of chitosan protons in D₂O/DCI at 70°C. The degree of deacetylation was calculated using integrals of the peak of proton H1 of deacetylated monomer (H1-D) and of the peak of the three protons of acetyl group (H-Ac):

$$\text{DDA}(\%) = \left(\frac{\text{H1-D}}{\text{H1-D} + \text{H-Ac}/3} \right) \times 100$$

Eq 3.1

For comparison, the DDA was also calculated with the method proposed by Hirai et al. (Hirai, Odani et al. 1991) by using the signal from protons H2, H3, H4, H5, H6, H6' (H2-6) of both monomers and the peak of acetyl group (H-Ac):

$$\text{DDA}(\%) = \left(1 - \left(\frac{\frac{1}{3} \text{H-Ac}}{\frac{1}{6} \text{H2-6}} \right) \right) \times 100$$

Eq 3.2

For DDA lower than 90%, the DDA was also calculated by using the peaks of protons H1 of both deacetylated and acetylated monomer (H1-D, H1-A):

$$\text{DDA}(\%) = \left(\frac{\text{H1-D}}{\text{H1-D} + \text{H1-A}} \right) \times 100$$

Eq 3.3

However, this equation is not suitable for high DDA because H1-A is not visible in the spectrum, as can be seen in **Figure 3.3**. Also, use of the acetyl group peak (H-Ac) presents two advantages over the use of the H1 peak of acetylated monomer (H1-A) (1), the H-Ac peak is three times more intense than the H1-A peak (2) and the H-Ac peak is well resolved with a flat baseline on each side of the peak. However, Eq 3.3 should be used if the H-Ac peak is not well resolved due to the presence of contaminants such as acetic acid in the sample. This is the case of chitosan PCCH00024 (see **Figure 3.4**) that contains acetic acid so that only Eq 3.3 was used to determine the DDA for this sample. The evaluation of the DDA using the area of the H2 peak of deacetylated monomer as proposed by Shigemasa et al. (Shigemasa, Matsuura et al. 1996) is not suitable because of the overlap with the peaks between ~3.8 and ~4.2 ppm. To evaluate the ruggedness of this method, three analysts contributed to this validation study and are referred to as Analyst A, Analyst B and Analyst C in the text.

3.4.1 Precision

Two analysts tested the precision of the method. Analyst A measured the DDA of all chitosan lots on two different days. For the second testing occasion, the same set of samples after 1 day of storage at room temperature was used. Analyst B tested the six different lots once. The results are presented in **Tableau 3.2**.

The %CVs of the inter-day and inter-analyst precision test were found to be less than 0.8%. The sample with the highest DDA was found to have the lowest CV and the inter-day/inter-analyst results were found to be close to each other. The results obtained by using Eq 3.1, Eq 3.2 and Eq 3.3 are consistent with each other, especially for chitosan samples with high DDA. The method is therefore precise to determine the DDA of highly deacetylated chitosan samples (see **Figure 3.3**). There is no significant difference between results obtained on the 1st and 2nd day of analysis by analyst A. Also the acetyl hydrolysis of chitosan in D₂O/DCI solution at room temperature was found to be negligible.

3.4.2 *Specificity*

The specificity of the method was tested by adding acetic acid to the chitosan samples. All samples were prepared fresh daily. Acetic acid protons resonate near the acetyl protons of chitosan and are a possible product of chitosan degradation. Acetic acid is also a possible residue of chitosan manufacturing. Four solutions were tested by analyst A: two solutions of PCCH00014 (DDA ~100%) with 0.052 mmol and 0.087 mmol of acetic acid, respectively and two solutions of PCCH00003 (DDA ~ 76%) with 0.052 mmol and 0.087 mmol of acetic acid, respectively. In the case of PCCH00014 samples, the peaks of acetic acid and acetyl protons of chitosan were well resolved and the DDA measured showed no significant difference from the DDA measured without acetic acid. In the case of PCCH00003, the two peaks could not be resolved and acetic acid peak contributed to the H-Ac term in Eq 3.1 and Eq 3.2. A lower DDA is expected

but the amount of acetic acid used is small compared to the concentration of acetylated monomer (the concentration of acetylated monomer is about 7 mmol) and the DDA of the two PCCH0003 solutions spiked with acetic acid showed no significant difference with the DDA found in the precision test. If a larger amount of acetic acid is present in solution, Eq 3.3 should be used in order to calculate the DDA as long as the DDA is not too high.

3.4.3 *Ruggedness*

The DDAs of chitosan batches PCCH00014 (DDA ~ 100%), PCCH00005 (DDA ~ 87%), PCCH00003 (DDA ~ 76%) and PCCH00024 (DDA ~ 48%) were measured by three analysts on two different testing occasions. All samples were prepared fresh daily. The results are presented in **Tableau 3.3**. The results obtained by using Eq 3.2 or Eq 3.3 are not presented here, but as in the precision test, the DDA's obtained by using these equations were found to be close to those obtained using Eq 3.1 (except for PCCH00024 for which the DDA is only evaluated using Eq 3.3). The difference between intra and inter-user results was very small as can be seen from **Tableau 3.3** showing the ruggedness of the technique. The NMR technique is reproducible and the small variation between results originates mainly from the phase adjustment and also from the integration boundaries setting.

3.4.4 Robustness

The robustness of the method was evaluated by varying four parameters independently: 1) the chitosan amount 2) the DCl amount 3) the temperature and 4) the number of transients. All samples were prepared fresh daily and the experiments were performed by analyst A. A variation of $\pm 20\%$ in chitosan mass or $\pm 10\%$ in DCl volume did not appreciably change the measured DDA of chitosan PCCH00013. Running the experiment at 65° or 75°C also did not affect the measured DDA of chitosan PCCH00002. Using a different number of transients such as 128 or 256 rather than 64 also did not affect the DDA measurement of chitosan's PCCH00014 and PCCH00003 thereby indicating that this method is quite robust in terms of the above-mentioned parameters.

3.4.5 Stability

The stability was tested by measuring the DDA after leaving a sample at 70°C for prolonged periods of time. Chitosan PCCH00024 and PCCH00003 were tested. The samples were prepared fresh daily. The ^1H NMR spectrum was acquired by analyst A in triplicate after 0h, 1h, 2h, 3h and 6h. Results obtained are presented in **Tableau 3.4**. For both samples, the DDA was found to increase slightly with time because of acid hydrolysis resulting in higher DDA and higher acetic acid content in solution. The variation after 6 hours was of the order of the precision of the technique. For PCCH00003, acetic acid protons and acetyl protons of chitosan peaks were not resolved and acetic acid resulting from deacetylation contributed to the H-Ac term in Eq 3.1 and

Eq 3.2. However the longitudinal relaxation time of protons of acetic acid is approximately 12 seconds at 70°C (Hirai, Odani et al. 1991) (much longer than acetyl protons of chitosan) so that the acetic acid peak intensity was not proportional to acetic acid content because of the too short delay between each pulse (8 seconds). This is why the DDA measured with Eq 3.2 was found to increase slightly with time. By using a longer recycle time like Hirai et al.(Hirai, Odani et al. 1991), the DDA determined using Eq 3.2 should not change but the total acquisition time would be much longer. The results found with Eq 3.3 are supposed to give the current DDA of the sample and the biggest changes in DDA should, therefore, be noted by using this equation. However, this is not perceptible because the variation of DDA after 6 hours at 70°C is still quite small (i.e. of the order of the precision of the technique).

3.4.6 Accuracy

The accuracy of the technique was tested by comparing the calculated (expected) and measured DDA of samples prepared by mixing solutions of chitosan PCCH00024 (DDA ~ 48%) and chitosan PCCH00014 (DDA ~ 100%) in variable volumetric ratios: 80:20, 50:50 and 20:80. Analyst A who was unaware of the composition of the test solutions performed the experiments. The results are presented in **Tableau 3.5**. The expected DDA of a solution obtained by mixing the two solutions of chitosan (denoted as solutions 1 and 2) is given by the following equation:

$$DDA = \frac{\frac{v_1 \times c_1}{\overline{M}_1} \times DDA_1 + \frac{v_2 \times c_2}{\overline{M}_2} \times DDA_2}{\frac{v_1 \times c_1}{\overline{M}_1} + \frac{v_2 \times c_2}{\overline{M}_2}} = \frac{\overline{M}_2 \times v_1 \times c_1 \times DDA_1 + \overline{M}_1 \times v_2 \times c_2 \times DDA_2}{\overline{M}_2 \times v_1 \times c_1 + \overline{M}_1 \times v_2 \times c_2}$$

Eq 3.4

where $\overline{M}_i$ is the monomer average molar weight for a chitosan with DDA=DDA_i and is given by $\overline{M}_i = \frac{[161.2 \times DDA_i + 203.2 \times (1 - DDA_i)]}{100}$ (161.2 g/mol and 203.2 g/mol are the molar weight of glucosamine and N-acetyl glucosamine, respectively), v_i is the volumetric fraction of solution i in the mixture and c_i is the concentration of chitosan (weight/volume) in solution i. The DDAs of PCCH00014 and PCCH00024 used in Eq 3.4 are 99.8% (found by analyst A using Eq 3.1 in the precision test) and 48.0% (found by analyst A using Eq 3.3 in the precision test), respectively. The DDA of the mixtures was measured by using Eq 3.3 because of the presence of acetic acid in chitosan PCCH00024. The expected and measured values were close to each other in all cases.

3.5 Conclusion

Liquid phase ^1H NMR is a very suitable method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. The technique is found to be fast, precise, reproducible, rugged, robust, stable and requires only a small amount of chitosan. The ruggedness of the method has been demonstrated by the low inter-analyst %CV. The accuracy of the technique was shown by mixing solutions of known DDA and retrieving the expected DDA values of the mixtures. The DDA calculated by using three different combinations of peaks are very close to each other demonstrating that the technique is also internally consistent.

Tableau 3.1. Chemical shifts and T_1 of protons of chitosan at 70°C in D₂O/DCI

		Protons				
		H1-D	H1-A	H-2/6	H-2-D	Acetyl protons
Chemical shift (ppm)		5.21	4.92	3.9 to 4.2	3.52	2.36
T_1 (sec)	DDA ~ 48%	1.12	1.12	< 1.10	1.42	1.56
	DDA ~ 100%	1.01	N/A	< 1.00	1.37	1.07

Tableau 3.2. Precision test results

Sample ID	DDA (%)								
	Determined using Eq 3.1			Determined using Eq 3.2			Determined using Eq 3.3		
	Analyst A 1 st day	Analyst A 2 nd day	Analyst B	Analyst A 1 st day	Analyst A 2 nd day	Analyst B	Analyst A 1 st day	Analyst A 2 nd day	Analyst B
PCCH00014	99.8 CV ^a =0.02	99.7 CV=0.02	99.6 CV=0.05	99.8 CV=0.02	99.7 CV=0.01	99.6 CV=0.05	N/A	N/A	N/A
PCCH00013	96.8 CV=0.1	96.7 CV=0.09	96.4 CV=0.2	97.0 CV=0.1	96.9 CV=0.07	96.6 CV=0.1	N/A	N/A	N/A
PCCH00005	87.4 CV=0.2	87.3 CV=0.08	86.8 CV=0.1	88.0 CV=0.08	88.0 CV=0.03	87.8 CV=0.1	87.5 CV=0.3	87.4 CV=0.6	87.6 CV=0.3
PCCH00002	81.6 CV=0.2	81.5 CV=0.2	81.5 CV=0.8	82.5 CV=0.08	82.5 CV=0.1	82.5 CV=0.1	82.4 CV=0.2	82.0 CV=0.1	82.1 CV=0.4
PCCH00003	75.9 CV=0.04	75.9 CV=0.4	76.2 CV=0.6	76.9 CV=0.05	77.0 CV=0.1	77.3 CV=0.1	76.7 CV=0.1	77.1 CV=0.3	76.9 CV=0.5
PCCH00024	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	48.0 CV=0.5	48.1 CV=0.3	48.7 CV=0.2

a: All CVs given in percentage.

Tableau 3.3. Ruggedness test results

Sample ID	DDA (%) determined using Eq 3.1 or Eq 3.3 ^a					
	Analyst A, 1 st day	Analyst A, 2 nd day	Analyst B, 1 st day	Analyst B, 2 nd day	Analyst C, 1 st day	Analyst C, 2 nd day
PCCH00014	99.8	99.8	99.7	99.7	99.6	99.5
	CV ^b =0.04	CV=0.01	CV=0.03	CV=0.06	CV=0.08	CV=0.05
PCCH00005	87.4	87.3	87.3	87.4	86.7	87.1
	CV=0.1	CV=0.09	CV=0.2	CV=0.2	CV=0.4	CV=0.2
PCCH00003	76.3	76.2	76.1	75.7	75.6	76.1
	CV=0.1	CV=0.3	CV=0.3	CV=0.2	CV=0.1	CV=0.4
PCCH00024	48.0	48.1	48.7	48.6	48.6	48.2
	CV=0.5	CV=0.3	CV=0.2	CV=0.4	CV=0.7	CV=0.7

a: Eq 3.3 was used for PCCH00024 only.

b: All CVs given in percentage.

Tableau 3.4. Stability test results

Sample ID	Equation used	DDA (%) measured after				
		0h	1h	2h	3h	6h
PCCH00003	Eq 3.1	75.7	76.0	76.2	76.5	77.0
		CV ^a =0.1	CV=0.05	CV=0.2	CV=0.1	CV=0.2
	Eq 3.2	76.5	77.0	77.3	77.54	78.0
		CV=0.8	CV=0.1	CV=0.1	CV=0.08	CV=0.1
	Eq 3.3	76.6	76.7	76.8	76.5	77.5
		CV=0.7	CV=0.4	CV=0.1	SD=0.3	SD=0.1
PCCH00024	Eq 3.3	47.6	48.0	48.3	48.4	48.9
		CV=0.2	CV=0.1	CV=0.2	CV=0.2	CV=0.2

a: All CVs given in percentage.

Tableau 3.5. Accuracy test results

Ratio (PCCH00024:PCCH00014)	Expected DDA (%)	Measured DDA (%) ^a
80:20	59.4	59.9 CV ^b =0.5
50:50	75.5	75.8 CV=0.3
20:80	90.4	89.6 CV=0.3

a: Determined with Eq 3.3.

b: All CVs given in percentage.

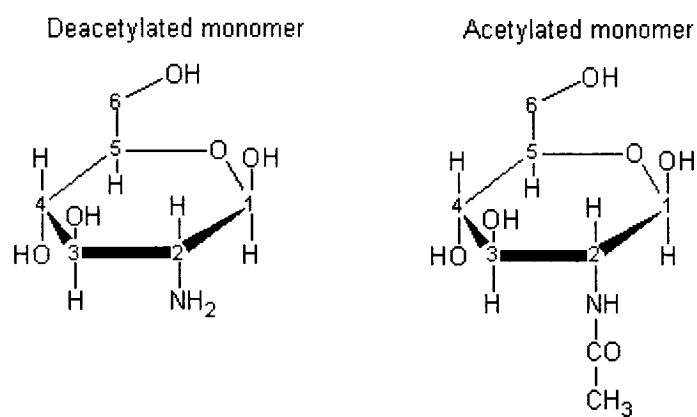


Figure 3.1. Acetylated and deacetylated monomers of chitosan

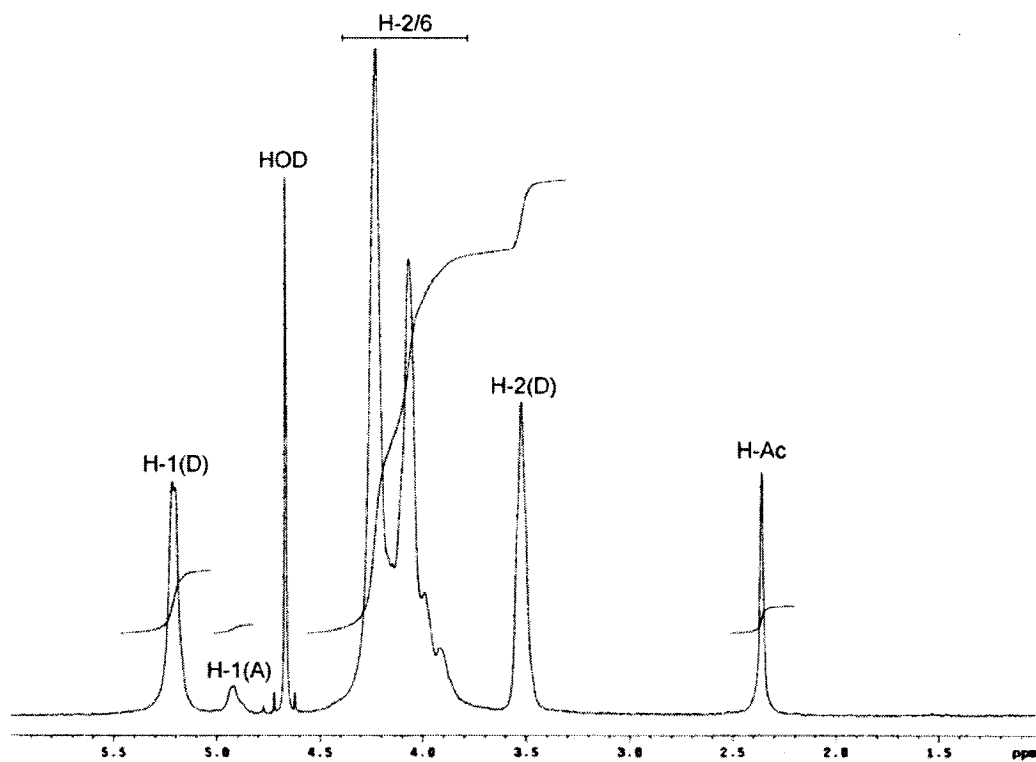


Figure 3.2. Chitosan (PCCH00005) ^1H NMR spectrum at 70°C

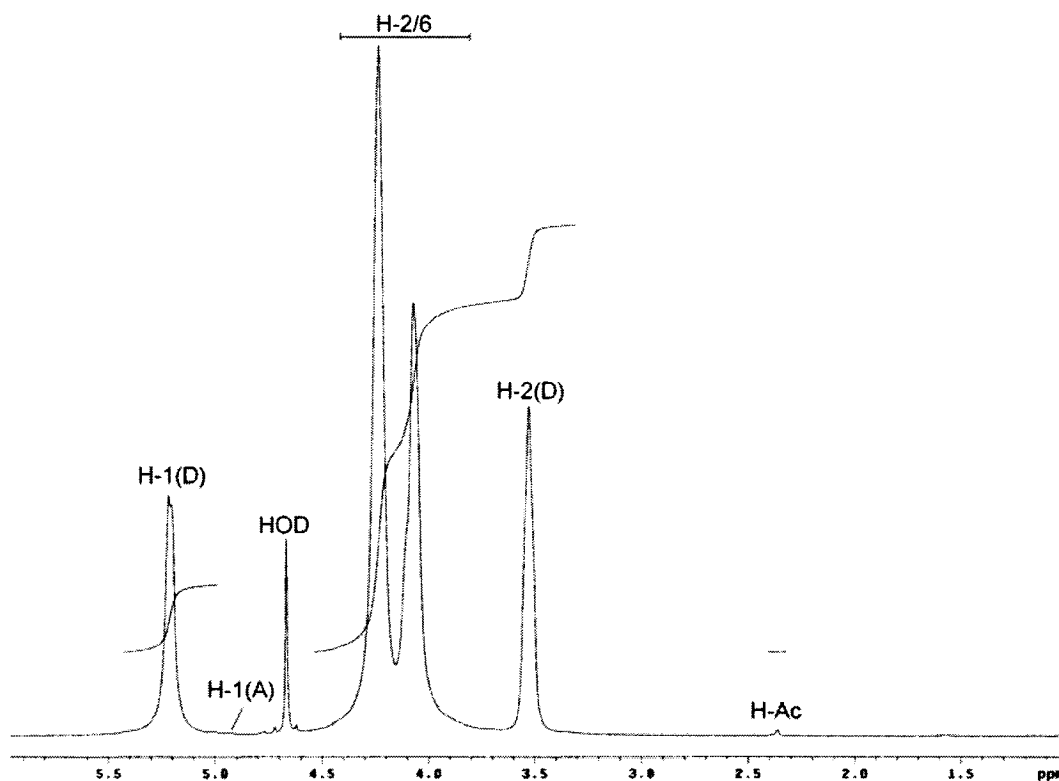


Figure 3.3. PCCH00014 ^1H NMR spectrum at 70°C. The small peak at 2.36 ppm originates from the acetyl protons of chitosan. The rms signal on noise ratio for this peak is approximately 3.1

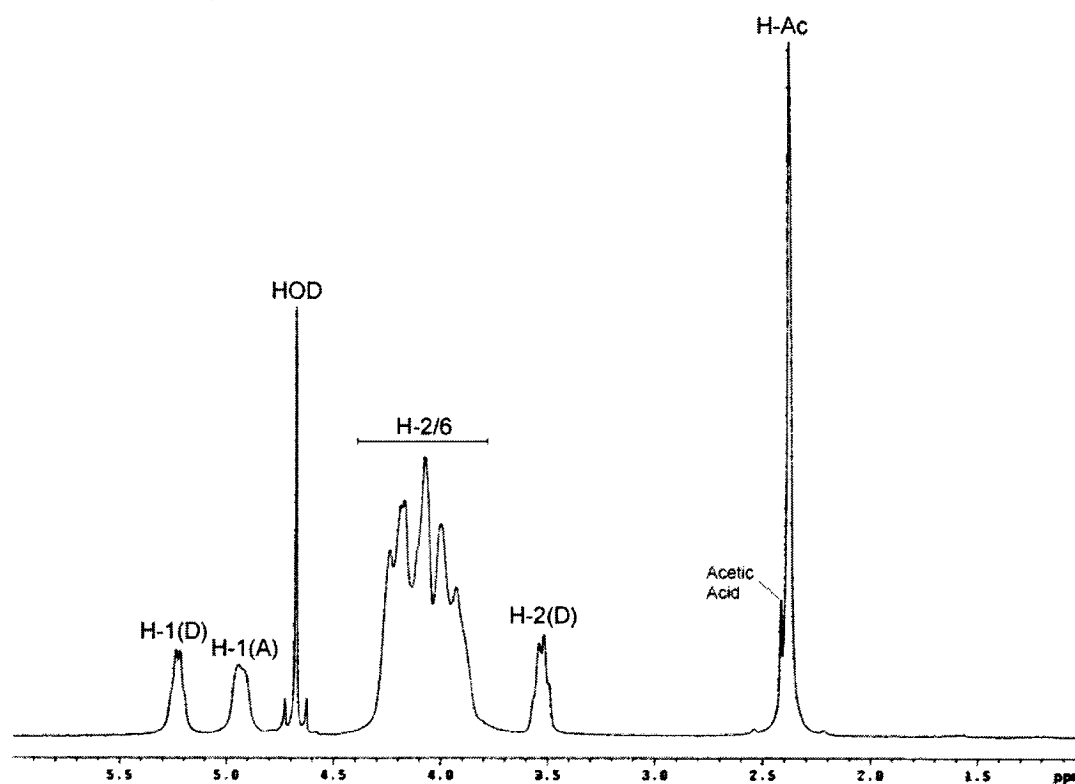


Figure 3.4. PCCH00024 ^1H NMR spectrum at 70°C. The peak at 2.41 ppm originates from acetic acid

CHAPITRE 4: TITRAGE DU CHITOSANE^a

4.1 Introduction

Le titrage potentiométrique est une technique classique des plus utilisées pour la caractérisation de polyélectrolytes en solution. Dans des études antérieures, on s'est intéressé au titrage du chitosane (Tsukada and Inoue 1981; Park, Choi et al. 1983; Domard 1987; Anthonsen and Smidsrod 1995; Sorlier, Denuziere et al. 2001; Strand, Tommeraas et al. 2001) ainsi qu'à sa précipitation (Rinaudo, Milas et al. 1993; Varum, Ottoy et al. 1994; Rinaudo, Pavlov et al. 1999) observée au cours de la neutralisation. Les valeurs de pK_a apparent (pK_{ap}) rapportées dans la littérature sont inférieures^b à celle du monomère de glucosamine en raison des effets électrostatiques de longue portée (Tsukada and Inoue 1981). Cet effet est atténué lorsque du sel est ajouté aux solutions testées. Les valeurs du pK_a intrinsèque (pK_0 , le pK_{ap} à degré d'ionisation nul) du chitosane rapportées sont inférieures à celle du glucosamine.

^a Les résultats présentés dans ce chapitre feront l'objet d'une publication dans la revue *Biomacromolecules* sous peu (Filion, Lavertu et al. 2007).

^b Seulement deux études (Anthonsen et Smidsrod 1995 et Strand, Tommeraas et al. 2001) rapportent des valeurs de pK_{ap} supérieures au pK_a du glucosamine. Ces résultats sont explicables par la présence d'une erreur de signe dans les équations utilisées dans ces deux articles.

L'objectif de ce chapitre est de caractériser le comportement acide-base du chitosane et de vérifier si un modèle du champ moyen basé sur l'application de l'équation de Poisson-Boltzmann dans une cellule cylindrique (Marcus 1955) peut prédire correctement la variation du pK_a du chitosane en fonction de α . Le chitosane a été titré avec du NaOH et l'influence de l'ajout de sel et de la composition chimique du chitosane (f_D) a été testée. L'influence de la concentration du polymère a été testée par des expériences de dilution. L'effet de la température sur la constante de dissociation du polymère sera présenté dans le prochain chapitre. Une connaissance de la relation entre le pK_{ap} et le degré d'ionisation du polymère permet de prédire la valeur de α dans des solutions composées de chitosane et d'un autre acide/base faible tel que le glycerol-phosphate (GP). Le chitosane est soluble en milieu acide lorsque son degré d'ionisation α est suffisamment élevé et que la force de répulsion électrostatique entre les double-couches domine les forces d'attraction intermoléculaires. Une connaissance précise de α est donc nécessaire pour analyser et prédire le comportement du chitosane en solution lorsque chauffé et ce sujet fait l'objet du prochain chapitre.

4.2 Théorie

Un modèle utilisant la cellule cylindrique pour représenter le chitosane a été utilisé pour le calcul du potentiel électrostatique moléculaire, ce dernier étant obtenu en procédant à la résolution de l'équation de Poisson-Boltzmann non-linéaire. Le modèle a été développé pour des solutions composées du polyélectrolyte cationique, de son

contre-ion anionique (Cl⁻), d'une base forte (NaOH) et d'un sel monovalent (NaCl). Le potentiel électrostatique moléculaire a été utilisé pour prédire le pH de solutions de chitosane, tel que décrit ci-dessous.

4.2.1 Paramètres structuraux du modèle de la cellule cylindrique

Le chitosane est composé de deux monomères distincts : une fraction f_D de glucosamine ionisable et une fraction $1 - f_D$ de N-acetyl-glucosamine non-ionisable (**Figure 4.1A**). Le chitosane est représenté par un cylindre imperméable infini de rayon a sur lequel les charges discrètes sont représentées par une densité de charge de surface uniforme σ (**Figure 4.1B**),

$$\sigma = \frac{e\alpha f_D}{2\pi al}$$

Eq 4.1

où e est la charge élémentaire, α est l'état de charge du chitosane ($\alpha=0$ est neutre, $\alpha=1$ est complètement ionisé) et l est la longueur du monomère (on utilise $l=0.52$ nm, valeur cristallographique (Mazeau, Winter et al. 1994; Okuyama, Noguchi et al. 1997)). La valeur utilisée pour le rayon du cylindre interne représentant le chitosane est de 1.3 nm, même si elle est supérieure à la valeur cristallographique rapportée qui est de 0.42nm (Mazeau, Winter et al. 1994). Pour le modèle cylindrique, il est fréquent d'utiliser une valeur du rayon du polyélectrolyte qui est supérieure à la valeur

cristallographique ou celle qu'on peut estimer par de simples considérations géométriques (Ullner 2002).

Chaque polymère est situé au centre d'une cellule cylindrique dont le rayon b (**Figure 4.1B**) est déterminé par la concentration c_p de monomères (incluant le glucosamine et le N-acetyl-glucosamine) et la longueur du monomère l :

$$b = \left(\frac{1}{\pi l c_p N_A} \right)^{1/2}$$

Eq 4.2

où N_A est le nombre d'Avogadro

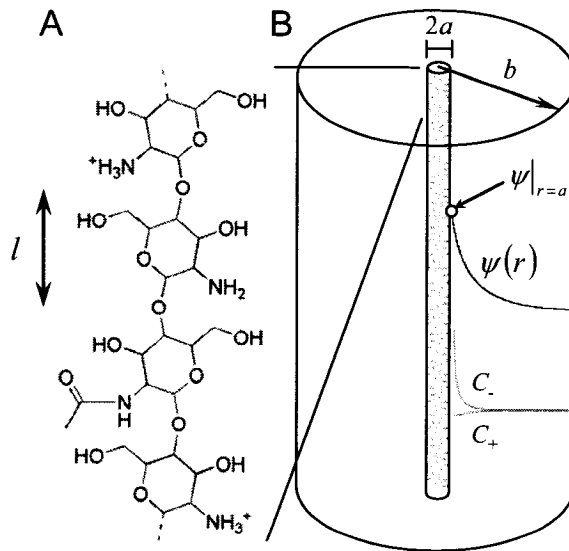


Figure 4.1. A) Un segment de quatre monomères de chitosane est représenté (deux monomères ionisés, un monomère neutre et un monomère N-acetyl-glucosamine non ionisable). Chaque monomère a une longueur l . B) Le cylindre de rayon a , correspond à

la chaîne de chitosane qui est entourée d'ions mobiles qui occupent le reste du volume de la cellule cylindrique qui s'étend jusqu'au rayon b . Des profils représentatifs du potentiel électrostatique $\psi(r)$, de la concentration c_- de contre-ions et de la concentration c_+ de co-ions, sont représentés pour le cas $c_{\text{NaCl}} = 15 \text{ mM}$ à $\alpha = 0.75$ et $f_D = 1.00$. Le cercle indique le potentiel électrostatique à la surface du polyélectrolyte, $\psi|_{r=a}$.

4.2.2 Profil des concentrations des contre-ions et des co-ions, valeurs macroscopiques moyennes et activités

Dans la cellule cylindrique, le chitosane est entouré par les ions mobiles confinés à la région $a < r < b$. En utilisant l'approximation du champ moyen (Marcus 1955), la concentration $c_i(r)$ de l'ion mobile i est donnée par la distribution de Boltzmann et le profil de concentration dépend de la position radiale r et du potentiel $\psi(r)$,

$$c_i(r) = c_i^0 e^{-\frac{z_i e \psi(r)}{kT}}$$

Eq 4.3

où z est la valence de l'ion mobile i , T est la température et k est la constante de Boltzmann. La valeur de c_i^0 est reliée à la concentration moyenne des ions positifs et négatifs, $\bar{c}_{\pm}$, dans la cellule cylindrique :

$$\bar{c}_{\pm} = c_{\pm}^0 \frac{\int_a^b 2re^{\mp \frac{e\psi(r)}{kT}} dr}{b^2} = \frac{c_{\pm}^0}{\gamma_{\pm}}$$

Eq 4.4

où l'on a considéré le cas d'un électrolyte mono-monovalent, $z_i = 1+$ ou $1-$.

$\gamma_{\pm} = b^2 \int_a^b 2re^{\mp \frac{e\psi(r)}{kT}} dr$ représentent les coefficients d'activité des ions mobiles dans la

cellule cylindrique et $\gamma_{\pm} \bar{c}_{\pm} = c_{\pm}^0$ sont les activités ($a_{\pm} = \gamma_{\pm} \bar{c}_{\pm} = c_{\pm}^0$) tel que dérivées auparavant (Marcus 1955) pour ce modèle.

4.2.3 L'Équation de Poisson-Boltzmann

Le potentiel électrostatique, $\psi(a < r < b)$, est obtenu à partir de la solution à l'équation de Poisson-Boltzmann (Fixman 1979; Carnie and Torrie 1984; Buschmann and Grodzinsky 1995) en coordonnées cylindriques,

$$\frac{d^2\psi(r)}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d\psi(r)}{dr} = -\frac{\rho(r)}{\epsilon} = -\frac{\sum_i z_i e c_i^0 e^{-\frac{z_i e \psi(r)}{kT}}}{\epsilon}$$

Eq 4.5

dont les conditions aux frontières sont obtenues par une application de la loi de Gauss

$$\left. \frac{d\psi(r)}{dr} \right|_{r=a} = -\frac{\sigma}{\epsilon} = -\frac{e\alpha f_D}{2\pi a l \epsilon} \quad \text{et} \quad \left. \frac{d\psi(r)}{dr} \right|_{r=b} = 0$$

Eq 4.6

où ε est la permittivité de l'eau et $\rho(r)$ est la densité de charge locale. La solution de Eq 4.5 doit aussi satisfaire la condition de conservation donnée par Eq 4.4 puisque la solution de polyélectrolyte est contenue dans un volume fermé et n'est pas en équilibre avec un bain infini.

Nous démontrons maintenant que le choix de la référence du potentiel électrique est arbitraire. Si on ajoute une constante C à la solution $\psi_{sol}(r)$ de Eq 4.4, Eq 4.5, et Eq 4.6, on voit que cette nouvelle fonction, $\psi_{sol}(r)+C$, satisfait les conditions aux frontières de Eq 4.6 puisque ces conditions n'impliquent que des dérivées du potentiel. On voit aussi qu'en modifiant les activités des ions mobiles c_-^0 and c_+^0 , pour qu'elles deviennent $c_-^0 e^{\frac{-eC}{kT}}$ and $c_+^0 e^{\frac{+eC}{kT}}$, respectivement, la condition de conservation (Eq 4.4) est elle aussi satisfaite. Finalement, en insérant $\psi_{sol}(r)+C$ dans Eq 4.5 et en utilisant $c_-^0 e^{\frac{-eC}{kT}}$ et $c_+^0 e^{\frac{+eC}{kT}}$ pour c_-^0 and c_+^0 , nous trouvons :

$$\begin{aligned} \frac{d^2(\psi_{sol}(r)+C)}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d(\psi_{sol}(r)+C)}{dr} &= \frac{d^2\psi_{sol}(r)}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d\psi_{sol}(r)}{dr} \\ &= \frac{e}{\varepsilon} \left(c_-^0 e^{\frac{-eC}{kT}} e^{\frac{e(\psi_{sol}(r)+C)}{kT}} - c_+^0 e^{\frac{+eC}{kT}} e^{\frac{-e(\psi_{sol}(r)+C)}{kT}} \right) = \frac{e}{\varepsilon} \left(c_-^0 e^{\frac{e\psi_{sol}(r)}{kT}} - c_+^0 e^{\frac{-e\psi_{sol}(r)}{kT}} \right) \end{aligned}$$

Eq 4.7

démontrant que $\psi_{sol}(r)+C$ est aussi une solution de l'équation PB qui satisfait les conditions aux frontières ainsi que la condition de conservation des ions mobiles lorsque

c_-^0 and c_+^0 deviennent $c_-^0 e^{\frac{-eC}{kT}}$ et $c_+^0 e^{\frac{+eC}{kT}}$, respectivement. Ce résultat démontre qu'il existe toujours un potentiel de référence (valeur de C) pour lequel les activités des ions mobiles sont égales ($c_-^0 = c_+^0$).

Dans ce chapitre, nous considérons 3 types d'ions mobiles, le contre-ion Cl^- (provenant du solvant HCl et du NaCl), le co-ion Na^+ (provenant de la dissociation du NaOH et du NaCl) et les protons (H^+). Les ions hydroxyle (OH^-) sont négligeables puisque seules des solutions acides sont considérées. Dans le but de faciliter la résolution numérique de Eq 4.5, nous choisissons des valeurs égales des activités des contre-ions et des co-ions,

$$c_{\text{Cl}}^0 = c_{\text{Na}}^0 + c_{\text{H}}^0 = c^0$$

Eq 4.8

qui implique simplement un choix particulier du potentiel de référence (valeur de C) tel que décrit plus haut. Soulignons que les ions Na^+ et H^+ peuvent être regroupés puisqu'ils sont tous deux décrits par la même distribution de Boltzmann. En utilisant cette dernière équation, Eq 4.5 peut donc être réécrite en fonction de c^0 seulement,

$$\frac{d^2\psi(r)}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d\psi(r)}{dr} = \frac{2ec^0}{\varepsilon} \sinh\left(\frac{e\psi(r)}{kT}\right)$$

Eq 4.9

Nous procédons à une résolution numérique de l'équation de PB (Eq 4.9) satisfaisant les conditions aux frontières (Eq 4.6) et les conditions de conservation (Eq 4.4). Cette

solution est obtenue pour une valeur donnée de α , qui définit la densité de charge surfacique σ du polymère (Eq 4.1) et pour une valeur donnée de la concentration de monomères c_p , qui définit la valeur du rayon de la cellule cylindrique b (Eq 4.2). Une valeur initiale de c^0 est sélectionnée et des itérations avec des valeurs différentes de c^0 sont effectuées jusqu'à ce que le terme de droite dans Eq 4.4 converge vers la valeur moyenne des concentrations expérimentales, $\bar{c}_{\pm}$. Cette solution obtenue pour $\psi(r)$ est finalement ajustée en lui soustrayant la valeur trouvée pour $\psi(b)$ de façon à redéfinir le potentiel de référence pour avoir $\psi(b) = 0$. Cet ajustement n'a aucune conséquence physique, mais il est conséquent avec la valeur de la référence choisie pour dériver Eq 4.11 ci-dessous. Ce potentiel de référence redéfinit $c_{\pm}^0$ comme la concentration des ions mobiles à $r = b$, ainsi que l'activité des ions $a_{\pm}$ dans la cellule cylindrique.

4.2.4 Expression théorique du pH en fonction de pK_0 , α et $\psi|_{r=a}$

Le pH est relié à l'activité du proton, a_H , dans la phase liquide par la relation suivante

$$\text{pH} = -\log_{10} a_H = -\log_{10} \gamma_+ \bar{c}_H = -\log_{10} c_H^0$$

Eq 4.10

où le terme le plus à droite comprend la concentration de protons, c_H^0 , à la périphérie de la cellule cylindrique, $r = b$. À cet endroit, $\psi(r=b) = 0$ et $d\psi(r=b)/dr = 0$, ce qui permet un comportement idéal des protons. En utilisant la condition d'équilibre selon laquelle les potentiels chimiques des protons du polyélectrolyte et ceux de la phase

liquide doivent être égaux, on obtient une relation théorique pour le pH en fonction de pK_0 , α et $\psi|_{r=a}$, le potentiel électrostatique à la surface du polyélectrolyte (Marcus 1955)

$$\text{pH} = pK_0(T) + \log_{10} \frac{1-\alpha}{\alpha} - \frac{e\psi|_{r=a}}{kT \ln 10}$$

Eq 4.11

où $pK_0(T)$ est la constante de dissociation intrinsèque du monomère glucosamine du chitosane. Une expression utile pour la comparaison avec l'expérience et qui permet de mettre en évidence les effets électrostatiques est le pK_a apparent ou le pK_{ap}

$$pK_{ap}(T) = \text{pH}(T) - \log_{10} \frac{1-\alpha}{\alpha} = pK_0(T) - \frac{e\psi|_{r=a}}{kT \ln 10}$$

Eq 4.12

Soulignons que pour un acide/base simple, $\psi|_{r=a} = 0$ dans le modèle développé ici, de sorte que $pK_{ap}(T) = pK_0(T) = pK_a(T)$.

4.2.5 L'électroneutralité et l'équation de Poisson-Boltzmann déterminent α et $\psi|_{r=a}$

Le degré d'ionisation, α , est requis pour le calcul du pH à partir de Eq 4.11 et pour trouver la valeur de $\psi|_{r=a}$ (Eq 4.9) qui apparaît aussi dans Eq 4.11. Pour déterminer α , la condition d'électroneutralité macroscopique est utilisée (en négligeant OH⁻)

$$\bar{c}_{\text{Cl}} - \bar{c}_{\text{Na}} - \bar{c}_{\text{H}} - c_{\text{g}}^+ = 0$$

Eq 4.13

où c_{g}^+ est la concentration de monomères glucosamine ionisés,

$$c_{\text{g}}^+ = \alpha f_{\text{D}} c_{\text{p}}$$

Eq 4.14

En utilisant Eq 4.10 et Eq 4.14 dans Eq 4.13, on obtient

$$\alpha = \frac{\bar{c}_{\text{Cl}} - \bar{c}_{\text{Na}} - \frac{10^{-\text{pH}}}{\gamma_+}}{f_{\text{D}} c_{\text{p}}}$$

Eq 4.15

α et $\psi|_{r=a}$ sont déterminés pour chaque valeur de pH obtenue dans les expériences de titrage et de dilution. Dans la plupart des cas, la concentration de protons, $10^{-\text{pH}}/\gamma_+$, est négligeable et α est simplement déterminé par la différence entre les concentrations d'ions Cl^- et Na^+ . Pour les cas où la concentration de protons doit être prise en compte, on assume $\gamma_+ = 1$ afin de simplifier les calculs. Soulignons que même pour les valeurs les plus élevées de $\psi(r)$, γ_+ n'est pas très différent de 1.

4.2.6 Détermination de $pK_0(T)$ et de l'effet de la concentration sur le pK_{ap}

Après avoir déterminé les valeurs de $\psi|_{r=a}$ et de α pour chaque pH dans une courbe de titrage (seulement les valeurs de pH pour lesquelles le chitosane est soluble), ces valeurs sont insérées dans Eq 4.11 et la valeur de $pK_0(T)$ est déterminée en minimisant l'écart

entre les courbes théorique et expérimentale. Les changements de pK_{ap} résultant de la dilution du chitosane sont directement déterminés à partir des changements de pH induits par dilution en utilisant l'équation ci-dessous (voir démonstration dans l'ANNEXE I)

$$dpK_{ap} = dpH + \frac{1}{\alpha(1-\alpha)} \left(\left(\frac{c_{H^+}}{c_g^t} + \frac{c_{OH^-}}{c_g^t} \right) dpH - \frac{c_{OH^-}}{c_g^t} dpK_{H_2O} \right)$$

Eq 4.16

où c_{H^+} et c_{OH^-} sont les concentrations des protons et des ions hydroxyle, $c_g^t = f_D c_p$ est la concentration totale du monomère glucosamine et pK_{H_2O} est la constante de dissociation de l'eau. Eq 4.16 est réduite à

$$dpK_{ap} \approx dpH$$

Eq 4.17

si

$$\frac{c_{H^+}}{c_g^t} \ll 1 \quad \text{and} \quad \frac{c_{OH^-}}{c_g^t} \ll 1$$

Eq 4.18

et si α n'est pas trop près de 0 ou 1. Lorsque ces conditions sont respectées, les changements induits par dilution de pK_{ap} par rapport à une concentration de référence arbitraire, c_{ref} , sont reliés directement aux variations de pH par

$$\Delta pK_{\text{ap}}(c) = pK_{\text{ap}}(c) - pK_{\text{ap}}(c_{\text{ref}}) = \text{pH}(c) - \text{pH}(c_{\text{ref}})$$

Eq 4.19

où c représente ici la concentration de chitosane. Soulignons que cette relation est valide lorsque d'autres paramètres sont variés, tels que la température et la concentration de sel ajoutée (c_{NaCl}).

4.3 Méthodologie expérimentale

4.3.1 Réactifs et solutions

Des chitosanes avec f_D variant de 0.72 à 0.98 fournis par BioSyntech, Laval, Qc, Canada sont utilisés pour le titrage et les expériences de dilution (**Tableau 4.1**). Du NaOH 1 N (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA, Cat No. 31,951-1) et du HCl 1 N (Sigma-Aldrich, Cat No. 31,894-9) sont utilisés pour préparer la solution de titrage et pour dissoudre le chitosane, respectivement. Des solutions de concentrations précises sont préparées à partir de chitosane séché à 60°C sous vide pendant 2 jours (Savant Instruments, Holbrook, NY, USA, modèle SS110).

Pour les expériences de titrage, le chitosane est dissout à une concentration de monomère glucosamine de 3 mM avec une quantité égale de HCl (ratio molaire glucosamine:HCl = 1:1) afin d'ioniser complètement le polymère. Les solutions sont préparées dans des fioles jaugées de 500 mL. La concentration de NaCl (c_{NaCl}) de la solution est ajustée en ajoutant un volume approprié d'une solution de NaCl 5 M (Fisher

Scientific, Mississauga, ON, Canada, Cat No. S271-1), résultant en une dilution maximale du monomère glucosamine et du HCl à 2.91 mM pour la quantité de NaCl la plus élevée ($c_{\text{NaCl}} = 150 \text{ mM}$).

Pour les expériences de dilution, des solutions de 30 mM (monomère glucosamine) sont préparées comme décrit plus haut, mais à un ratio molaire HCl :glucosamine de 0.75 :1. La concentration de NaCl est ensuite ajustée en ajoutant un volume approprié de NaCl 5 M. Ces solutions de chitosane sont diluées de 30 à 1.875 mM (glucosamine) tout en mesurant le pH. Les conditions suivantes sont testées: 1) le chitosane sans sel ajouté est dilué avec de l'eau déionisée 2) le chitosane en présence d'un excès de sel ($c_{\text{NaCl}} = 300 \text{ mM}$) est dilué avec de l'eau déionisée et 3) le chitosane en présence d'un excès de sel ($c_{\text{NaCl}} = 300 \text{ mM}$) est dilué avec du NaCl 300 mM. La variation du pK_{ap} dans ces expériences correspond à la variation de pH puisque $\alpha=0.75$ est constant au cours de la dilution et que la concentration de protons est négligeable (voir Eq 4.19).

Tableau 4.1. Chitosanes.

f_D	M_n^a (kDa)	PDI ^b
0.72	553	2.3
0.85	226	1.7
0.98	103	1.6

^aPoids moléculaire moyenne en nombre (M_n) déterminée par diffusion de lumière/GPC (Brugnerotto, Desbrieres et al. 2001) et ^b indice de polydispersité ($PDI = M_w/M_n$). Données fournies par BioSyntech.

4.3.2 Titration et dilution

Un montage expérimental (voir **Figure 4.2**) mis au point par Dominic Filion (Filion 2005) est utilisé pour les expériences de titration et de dilution. Ce montage permet les mesures simultanées du pH et de la transmittance (L_T), cette dernière servant à détecter la précipitation du chitosane. Les solutions sont titrées dans un bécher de 50 mL à double paroi (Fisher Scientific, Cat No. 317000-0050) rattaché à un bain circulant (Fisher Scientific, Neslab, modèle RT-111) qui permet un contrôle précis de la température. L'électrode de pH (Fisher Scientific, Cat 13-641-816), connectée à un pHmètre Accumet (Fisher Scientific, Modèle 20) est calibrée avec des solutions standards NIST à température de la pièce. Une sonde compensant pour les changements de température (sonde ATC, Fisher Scientific, Cat. 13-620-16A) est placée dans la solution testée. Des solutions de 20 mL sous agitation sont titrées en effectuant 20 injections de 0.3 mL de NaOH 0.01 N à l'aide d'un titrateur automatique (Schott Instruments, Mainz, Allemagne, Schott Titronic Universal). Le délai entre les injections est de 2 minutes. Pour les expériences de dilution, de l'eau déionisée ou du NaCl 300 mM est ajouté par la burette automatique. Afin de détecter la précipitation du chitosane, la transmittance, L_T , de la solution est mesurée durant le titrage en faisant passer le faisceau d'une diode laser 635 nm (Coherent, Santa Clara, CA, USA, 5 mW, 31-0128) à

travers la solution et le bécher. L'intensité transmise est mesurée par un photodétecteur (Coherent, Laser-Q VIS, 33-0241). Le point de précipitation est déterminé par une diminution abrupte de L_T suite à l'injection de titrant (voir **Figure 4.3**). La valeur de α à laquelle cette diminution abrupte de L_T survient est appelée α_p .

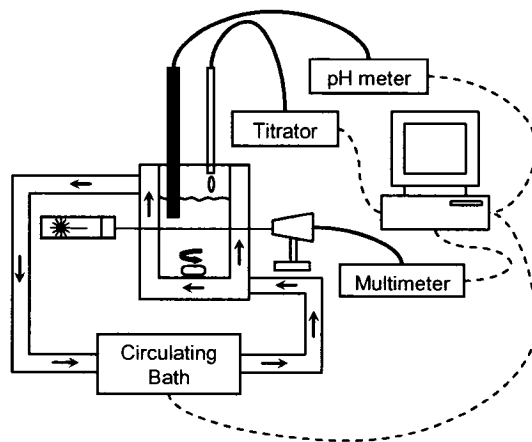


Figure 4.2. Le montage expérimental effectuant les titrages à température contrôlée tout en enregistrant la température, le pH et la transmittance (L_T) des solutions. La température est contrôlée par un bain circulant et l'intensité du laser transmise au travers du bécher à double paroi et de la solution est mesurée par un photodétecteur. Ce montage a été mis au point par Dominic Filion (Filion 2005).

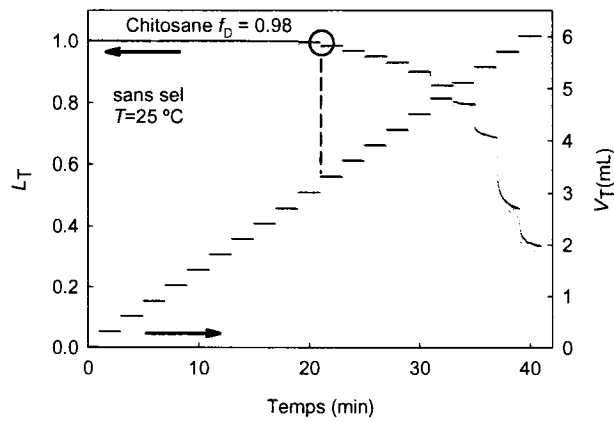


Figure 4.3. Transmittance (L_T) et volume de titrant ajouté (V_T) en fonction du temps. La première diminution de L_T (cercle) résultant de la précipitation du chitosane survient ici après un ajout de 3.3 mL de NaOH 0.01N. La valeur de α_p est déterminée à partir de Eq 4.14 en utilisant les concentrations connues de Na^+ , Cl^- and c_p à cette valeur de V_T .

4.4 Résultats

4.4.1 Influence de la force ionique et du degré de désacétylation (f_D) sur le titrage (pK_{ap} et pK_0) et la précipitation (α_p) du chitosane.

Pour les degrés d'ionisation relativement élevés ($\alpha > 0.5$), l'augmentation de la force ionique résulte en une augmentation significative du pK_{ap} du chitosane (**Figure 4.4**). Des mesures similaires sur le monomère de glucosamine révèlent un changement minimal du pK_a , indiquant que l'influence du sel sur le pK_{ap} du chitosane est dû à la modulation du potentiel de surface, $-e\psi|_{r=a}/kT \ln 10$ dans Eq 4.12. Cette conclusion est aussi supportée par le modèle PB qui prédit une diminution significative du potentiel de surface $\psi|_{r=a}$ lorsque la force ionique augmente (**Figure 4.5A**) et par le fait que ce modèle décrit bien le comportement de titrage du chitosane (**Figure 4.4**). Le degré d'ionisation à la précipitation, α_p , augmente avec la force ionique (**Tableau 4.2**), probablement en raison de l'augmentation de l'écrantage électrostatique qui facilite le rapprochement des chaînes et la précipitation.

L'augmentation de f_D résulte en une réduction modeste du pK_{ap} (**Figure 4.6**) qui est aussi prédite par modèle PB (**Figure 4.5B**). Cette diminution de pK_{ap} avec l'augmentation de f_D est plus importante lorsqu'aucun sel n'est ajouté (**Figure 4.6**). C'est au niveau du degré d'ionisation à la précipitation, α_p , que l'influence de f_D est la plus marquée, les chitosanes de f_D élevé précipitant à des valeurs de α plus élevées

(**Tableau 4.2**). Par exemple, pour des solutions sans sel ajouté, le chitosane de $f_D = 0.98$ précipite à $\alpha_p = 0.50$ alors qu'un chitosane de $f_D = 0.72$ précipite à $\alpha_p = 0.25$.

La constante de dissociation intrinsèque, pK_0 , obtenue à partir d'une extrapolation linéaire à $\alpha = 0$ de la courbe $pK_{ap}(\alpha)$ (**Figure 4.6**) dépend légèrement de la concentration de sel ajouté et de f_D (pK_0^{lin} dans la **Tableau 4.2**). Le pK_0^{lin} le plus faible ($pK_0^{\text{lin}} = 6.40$ à 25°C) a été obtenu pour le chitosane de $f_D=0.98$ en absence de sel et le pK_0^{lin} le plus élevé ($pK_0^{\text{lin}} = 6.71$ à 25°C) a été obtenu pour le même chitosane avec une concentration de NaCl (c_{NaCl}) de 150 mM.

Les pK_0 obtenus à partir du modèle PB (**Figure 4.4** et pK_0^{PB} dans le **Tableau 4.2**) dépendent moins de c_{NaCl} et de f_D que pK_0^{lin} . On ne dénote aucune influence de f_D sur le pK_0^{PB} pour une valeur donnée de c_{NaCl} alors que les valeurs de pK_0^{PB} à $c_{\text{NaCl}} = 150$ mM sont légèrement supérieures à celles trouvées à $c_{\text{NaCl}} = 0$ ou 15 mM. La seule exception à cette tendance est le cas $f_D = 0.98$, $c_{\text{NaCl}} = 0$ mM pour lequel la courbe théorique ne représente pas aussi bien les données expérimentales que pour les autres conditions (**Figure 4.4**). On parvient à mieux reproduire les données expérimentales en utilisant une valeur plus grande du rayon du chitosane, $a = 1.5$ nm plutôt que 1.3 nm, et on trouve alors une valeur de pK_0 de 6.69 qui s'inscrit dans la tendance observée pour les autres conditions.

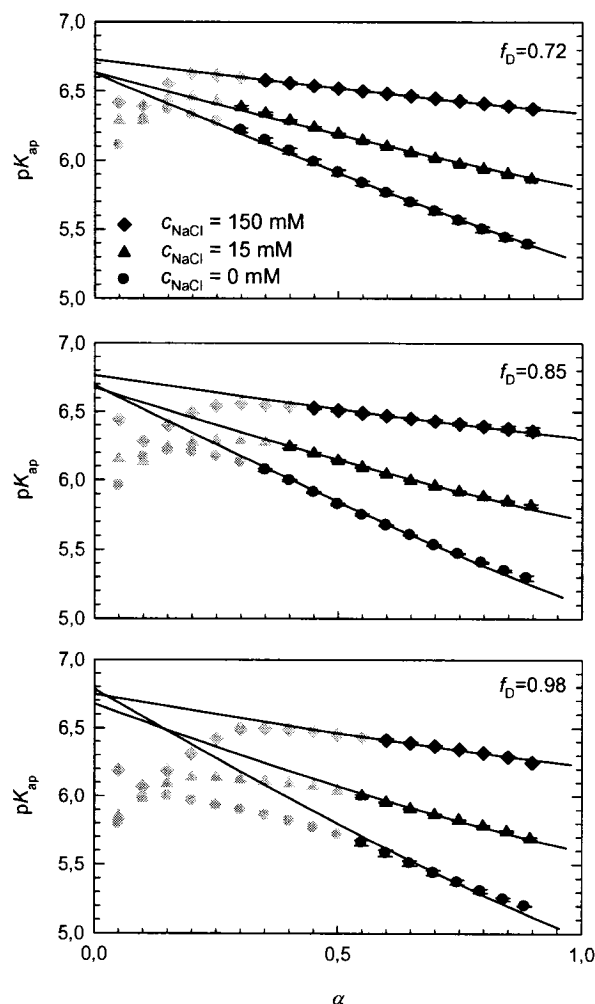


Figure 4.4. Courbes de $pK_{ap}(\alpha)$ du chitosane à 25°C (moyenne $\pm$ SD, $n = 3$) pour neuf combinaisons de f_D et c_{NaCl} comparées aux prédictions du modèle PB (lignes continues). Les symboles gris représentent des données recueillies après la précipitation. Les courbes théoriques sont obtenues en utilisant $a = 1.3$ nm (rayon du polyélectrolyte) et $l = 0.52$ nm (distance entre les sites chargés sur la chaîne) et en ajustant ensuite $pK_0(T)$ tel que décrit dans la section 4.2.6. La dilution résultant de l'ajout de titrant est prise en compte dans les calculs.

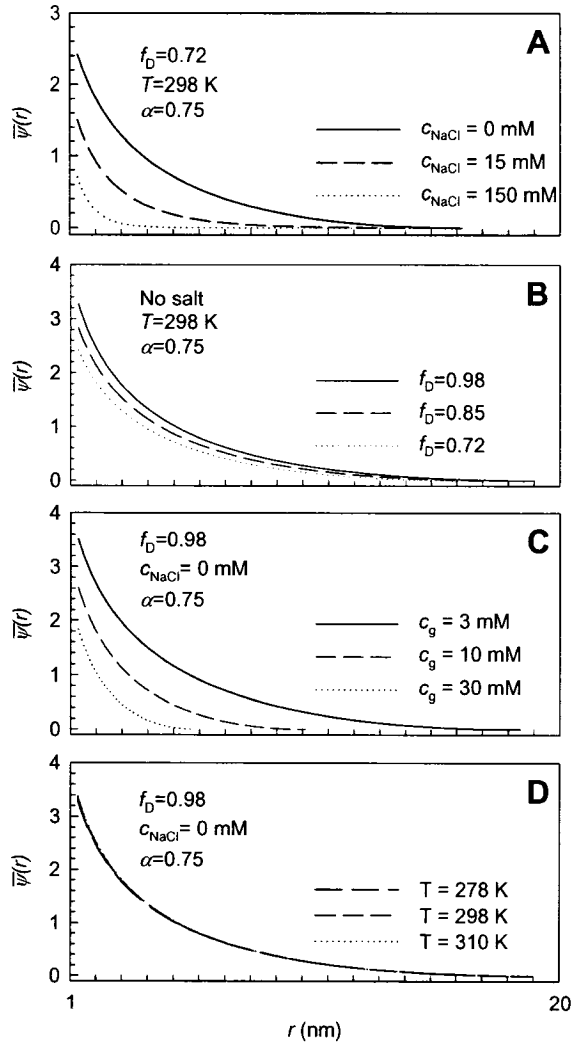


Figure 4.5. Le potentiel électrostatique normalisé $\bar{\psi}(r) = e\psi(r)/kT$, solution de l'équation PB, de la surface du macroion ($r = a = 1.3$ nm) jusqu'à la périphérie de la cellule cylindrique ($r = b$). La valeur de b varie avec la concentration en C selon Eq 4.2 et avec α en raison de la dilution due à l'ajout de titrant. Soulignons que b varie aussi avec f_D puisque c 'est la concentration initiale de monomères qui est constante (3 mM) et non pas c_p dans Eq 4.2. Les courbes théoriques ont été obtenues pour mettre en évidence l'effet des paramètres suivants: (A) la concentration de sel ajouté, c_{NaCl} , (B) le degré de

désacétylation, f_D , (C) la concentration de chitosane représentée par la concentration de monomère glucosamine c_g à 25°C et (D) la température T (la permittivité relative de l'eau utilisée est de 86, 78, and 74 à 278, 298 et 310 K, respectivement (valeurs prises dans l'Annexe 1.1 du livre *Electrolyte Solutions* (Robinson and Stokes 2002))). $\bar{\psi}(r) = e\psi(r)/kT$ augmente lorsque α ou f_D augmente et lorsque c_{NaCl} ou la concentration de chitosane diminue alors qu'aucun changement significatif du potentiel normalisé n'est observée lorsque la température est variée.

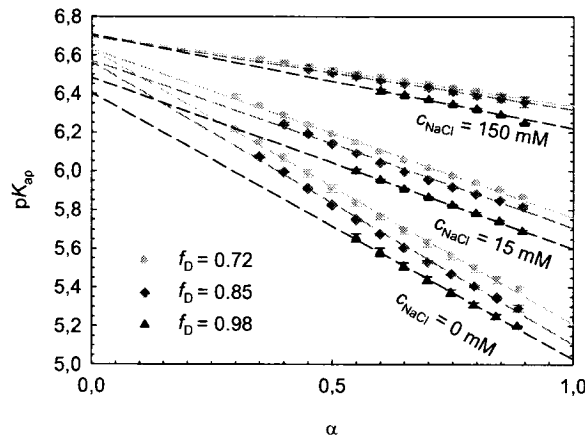


Figure 4.6. Courbes de $pK_{ap}(\alpha)$ du chitosane à 25°C (moyenne $\pm$ SD, $n = 3$) pour neuf combinaisons de f_D et c_{NaCl} comparant directement les trois chitosanes testés. Les régressions linéaires sont représentées par des lignes discontinues. Les solutions de chitosanes de concentration en monomère glucosamine de 3 mM ont été titrées avec du NaOH 0.01 N, tel que décrit dans la Méthodologie. Pour plus de clarté, seuls les points

obtenus dans la zone de solubilité du chitosane sont présentés (voir **Figure 4.4.** pour les données dans la zone de précipitation).

Tableau 4.2. Degré d'ionisation du chitosane à la précipitation, α_p , pK_0 et pente de $pK_{ap}(\alpha)$, $\Delta pK_{ap}/\Delta\alpha$, mesurés à 25 °C pour les neuf combinaisons de f_D , c_{NaCl} testées.

	c_{NaCl} (mM)	f_D		
		0.72	0.85	0.98
$\alpha_p^a (\pm 0.05)$	0	0.25 ^b	0.30	0.50 ^b
	15	0.25	0.35	0.50
	150	0.30	0.40	0.55
$pK_0^{PB\ c}$	0	6.63 $\pm$ 0.02	6.69 $\pm$ 0.01	6.78 $\pm$ 0.02
	15	6.64 $\pm$ 0.01	6.67 $\pm$ 0.01	6.67 $\pm$ 0.01
	150	6.73 $\pm$ 0.01	6.76 $\pm$ 0.01	6.75 $\pm$ 0.01
$pK_0^{lin\ d}$	0	6.63 $\pm$ 0.02	6.56 $\pm$ 0.03	6.40 $\pm$ 0.05
	15	6.63 $\pm$ 0.01	6.57 $\pm$ 0.02	6.48 $\pm$ 0.02
	150	6.70 $\pm$ 0.01	6.70 $\pm$ 0.02	6.71 $\pm$ 0.02
$-\Delta pK_{ap}/\Delta\alpha^{PB\ e}$	0	1.35 (0.014)	1.55 (0.017)	1.68 (0.04)
	15	0.81 (0.011)	0.91 (0.01)	0.97 (0.011)
	150	0.38 (0.002)	0.43 (0.008)	0.48 (0.009)
$-\Delta pK_{ap}/\Delta\alpha^{lin\ f}$	0	1.41 $\pm$ 0.01	1.46 $\pm$ 0.04	1.38 $\pm$ 0.04
	15	0.87 $\pm$ 0.01	0.86 $\pm$ 0.03	0.88 $\pm$ 0.02
	150	0.37 $\pm$ 0.01	0.38 $\pm$ 0.04	0.49 $\pm$ 0.02

^a Calcul de α_p à partir des mesures expérimentales ($n = 3$ avec une erreur de ± 0.05).

^b Des valeurs similaires ont été obtenues à 5°C et 37°C avec $n = 3$.

^c pK_0^{PB} est la valeur théorique de pK_0 obtenue en utilisant $a = 1.3$ nm dans le modèle PB, tel que décrit dans la section Détermination de $pK_0(T)$ et de l'effet de la concentration sur le pK_{ap} . L'erreur correspond à un écart-type, $n = 3$.

^d pK_0^{lin} est la valeur de l'ordonnée à l'origine des régressions linéaires effectuées à partir des valeurs expérimentales de pK_{ap} dans la zone non-précipitée et avec $\alpha \leq 0.90$. L'erreur correspond à un écart-type, $n = 3$.

^e $\Delta pK_{ap}/\Delta \alpha^{PB}$ est la valeur de la pente obtenue en effectuant une régression linéaire à partir des valeurs théoriques du pK_{ap} (voir la note ^c) dans la zone non-précipitée et avec $\alpha \leq 0.90$. La valeur entre parenthèse est la racine de l'écart carré moyen entre les points expérimentaux et théoriques, un indicateur de la qualité du modèle.

^f $\Delta pK_{ap}/\Delta \alpha^{lin}$ est la valeur de la pente obtenue dans la régression linéaire décrite au point ^d. L'erreur correspond à un écart-type, $n = 3$.

4.4.2 Non-linéarité et convexité du $pK_{ap}(\alpha)$ théorique

Le modèle de PB (**Figure 4.5**) montre que le potentiel de surface normalisé est typiquement supérieur à l'unité (à l'exception des cas avec $c_{NaCl} = 150$ mM ou pour les faibles valeurs de α) indiquant que la linéarisation de l'équation de Poisson-Boltzmann ne serait pas une approximation justifiée dans ces conditions. Ainsi, une variation non-linéaire du potentiel avec α est attendue, particulièrement pour les valeurs de c_{NaCl} de 0 et 15 mM. Lorsque le modèle de PB est utilisé pour le calcul du potentiel électrostatique de surface $\psi|_{r=a}$ afin de calculer le pH (Eq 4.11) ainsi que le pK_{ap} (Eq 4.12), on trouve que $\psi|_{r=a}$ est une fonction concave de α de telle sorte que le pK_{ap} (Eq 4.12) est une fonction convexe de α (**Figure 4.7**). La non-linéarité et la convexité de $pK_{ap}(\alpha)$ sont plus prononcées pour les cas sans sel et plus particulièrement lorsque seulement les contre-ions sont présents (**Figure 4.7A**, $c_{NaCl} = 0$ mM, sans co-ions). Une conséquence

importante de cette non-linéarité de $pK_{ap}(\alpha)$ est qu'elle permet d'expliquer la différence entre les pK_0 trouvés par extrapolation linéaire à $\alpha = 0$ (pK_0^{lin}) et les pK_0 trouvés avec le modèle PB (pK_0^{PB}). Les valeurs de pK_0^{lin} sont toujours inférieures à celles du modèle PB (**Figure 4.7** et **Tableau 4.2**). Cette différence est plus importante en l'absence de sel ajouté et lorsque f_D est élevé, et aussi lorsque l'extrapolation est effectuée avec un nombre limité de points, tel que prévu par la non-linéarité plus prononcée de la courbe théorique du pK_{ap} lorsque $c_{NaCl} = 0$ mM et que f_D est élevé (voir **Figure 4.7**). Par exemple, la plus grande différence entre pK_0^{PB} et pK_0^{lin} (**Tableau 4.2**) est observée pour le cas $f_D = 0.98$ et $c_{NaCl} = 0$ mM, avec $pK_0^{PB} = 6.78$ et $pK_0^{lin} = 6.40$ alors que pour $c_{NaCl} = 150$ mM, les valeurs de pK_0^{PB} et pK_0^{lin} sont de 6.75 et 6.71, respectivement.

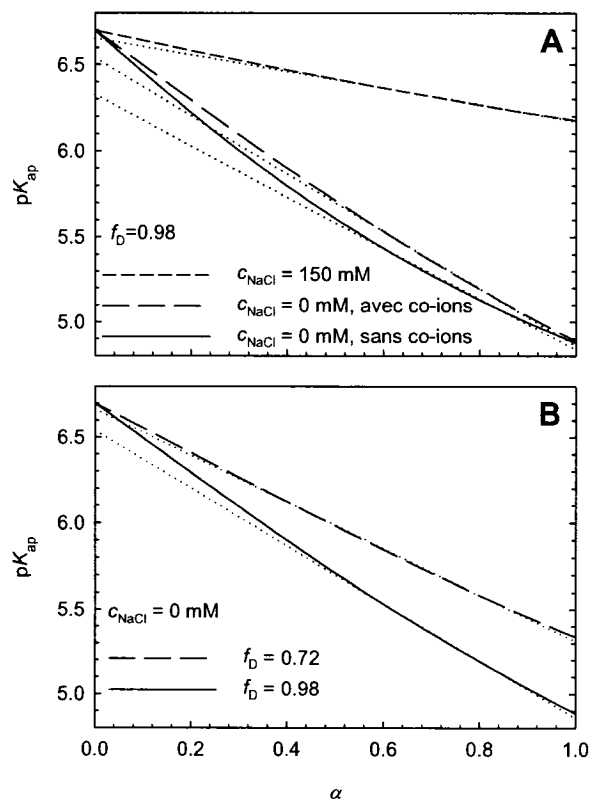


Figure 4.7. Courbes de $pK_{ap}(\alpha)$ théoriques (lignes continues et discontinues) comparées aux régressions linéaires effectuées sur ces mêmes courbes théoriques (lignes pointillées adjacentes). Ces régressions sont effectuées dans la zone non-précipitée (**Figure 4.4** et **Tableau 4.2**) et pour $\alpha \leq 0.90$. $pK_0 = 6.7$, $a = 1.3$ nm et une concentration de monomère glucosamine de 3 mM sont utilisés dans le modèle PB. A) Calculs avec $f_D = 0.98$ pour des solutions contenant 1) aucun sel, aucun co-ion et du HCl ajouté pour varier α 2) aucun sel mais des co-ions, une quantité constante de HCl à un ratio molaire HCl:glucosamine de 1:1 et du NaOH ajouté pour varier α et 3) comme en 2) mais avec 150 mM de NaCl ajouté. Les régressions ont été effectuées dans les plages $0.55 < \alpha < 0.90$ et $0.6 < \alpha < 0.90$ pour $c_{NaCl} = 0$ mM et $c_{NaCl} = 150$ mM, respectivement. Le pK_0 obtenu par extrapolation des régressions linéaires est inférieur au pK_0 trouvé avec le

modèle PB en raison de la non-linéarité et de la convexité du modèle. B) Comparaison des chitosanes avec $f_D = 0.72$ et $f_D = 0.98$ pour les cas sans sel et sans co-ions. Les régressions linéaires ont été effectuées sur les intervalles $0.30 < \alpha < 0.90$ et $0.55 < \alpha < 0.90$ pour $f_D = 0.72$ et $f_D = 0.98$, respectivement.

4.4.3 *Influence de la concentration de chitosane sur le pK_{ap}*

L'influence de la concentration du chitosane sur pK_{ap} à 25°C a été testée en procédant à des expériences de dilution sur un chitosane avec $f_D = 0.75$ à $\alpha = 0.75$. Le pK_{ap} diminue de façon significative, par plus de 0.4 unité, lorsque le chitosane est dilué de 30 à 3 mM (glucosamine), que du sel soit présent initialement ou non (**Figure 4.8A**). Par contre, pour une solution de chitosane comprenant un excès de sel que l'on dilue avec une solution avec excès de sel à la même concentration, on ne note aucun effet sur le pK_{ap} (**Figure 4.8A**). Le pK_{ap} du chitosane dépend donc fortement de la concentration du chitosane lorsqu'aucun sel n'est présent ou que la concentration de sel change elle aussi lors de la dilution du chitosane. Ces résultats sont aussi bien prédits par le modèle PB (**Figure 4.8B**) puisque la dilution du chitosane lorsque le sel n'est pas en excès résulte en une augmentation du potentiel de surface $\psi|_{r=a}$ (**Figure 4.5C**) et mène à une diminution du pH ou de façon équivalente à une diminution du pK_{ap} . Soulignons qu'en l'absence de sel, la variation du potentiel de surface calculée par le modèle PB en fonction du logarithme de la concentration de glucosamine est pratiquement linéaire dans la gamme 1-30 mM (en médaillon dans la **Figure 4.8**). Ce résultat a déjà été rapporté par Nitta et al. (Nitta and Sugai 1974).

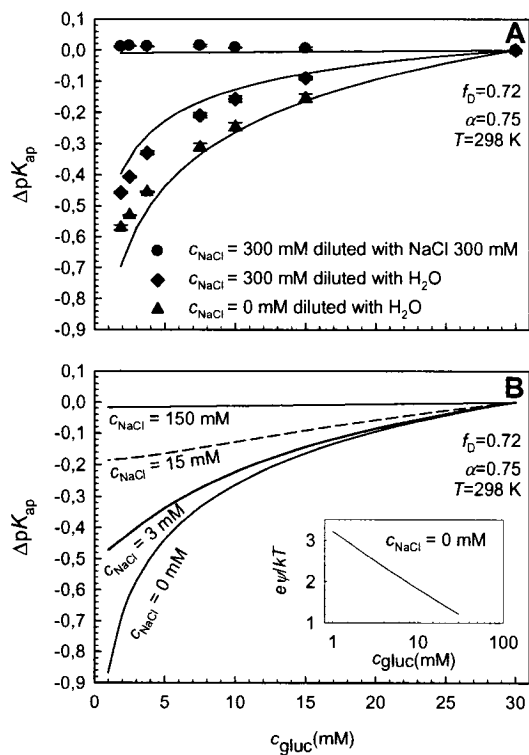


Figure 4.8. Influence de la concentration du chitosane (concentration de monomère glucosamine, c_{gluc}) sur son pK_{ap} à 25°C ($\Delta pK_{\text{ap}}(c_{\text{gluc}}) = pK_{\text{ap}}(c_{\text{gluc}}) - pK_{\text{ap}}(c_{\text{gluc}} = 30\text{mM})$).

A) Dilution du chitosane ($f_D = 0.72$) à un ratio molaire HCl:glucosamine de 0.75. Les lignes continues correspondent au modèle PB. B) Le modèle PB pour un chitosane ($f_D = 0.72$) dissout à un ratio molaire HCl:glucosamine de 0.75 et dilué ensuite avec des solutions de NaCl de diverses concentrations. La concentration en NaCl de la solution de chitosane est la même que celle de la solution utilisée pour la dilution.

4.5 Discussion

L'objectif principal de ce chapitre était de caractériser le comportement acide-base du chitosane en fonction de la force ionique, du degré de désacétylation (f_D), de la concentration de chitosane et de vérifier l'applicabilité à ce système d'un modèle théorique du champ moyen basé sur l'équation de Poisson-Boltzmann. Nous avons montré que l'augmentation de la concentration de sel (c_{NaCl}) résulte en une augmentation marquée du pK_{ap} (**Figure 4.4** et **Figure 4.6**) puisque l'écrantage électrostatique augmenté facilite la protonation du chitosane (Sorlier, Denuziere et al. 2001) en réduisant le potentiel électrostatique en surface de ce dernier (voir Eq 4.12). Nous avons aussi mis en évidence une légère diminution du pK_{ap} pour les valeurs de f_D plus élevées (**Figure 4.5C** et **Figure 4.6**), résultat qui est accord avec les prédictions du modèle théorique puisque la densité de charge surfacique augmente avec f_D . Cette diminution de pK_{ap} avec f_D est similaire à celle rapportée dans une étude où le chitosane était titré en présence de 100 mM $KClO_4$ (Sorlier, Denuziere et al. 2001). Elle n'est cependant pas aussi marquée que celle rapportée par Domard (Domard 1987). Nous avons observé que le sel ainsi que le degré de désacétylation (f_D) influencent la valeur du degré d'ionisation à la précipitation, α_p . La valeur de α_p augmente lorsque c_{NaCl} ou f_D augmente (**Tableau 4.2**). L'effet du sel est le résultat d'une augmentation de l'écrantage électrostatique qui facilite le rapprochement des chaînes et la précipitation est ainsi observée à des valeurs plus élevées de α . Pour ce qui est de l'influence de f_D , il semble que la présence de groupes acétyle sur la chaîne parvient à bloquer les associations inter-chaînes,

possiblement en raison d'un encombrement stérique et/ou d'un alignement plus difficile des chaînes avec une augmentation de la proportion de groupes acétyl, tel que proposé par Varum et al. (Varum, Ottoy et al. 1994). Cet effet de f_D sur la solubilité du chitosane a été rapporté dans plusieurs études (Domard 1987; Varum, Ottoy et al. 1994; Sorlier, Denuziere et al. 2001). Même si les effets de température seront discutés plus en détail au chapitre suivant, soulignons que les calculs effectués avec le modèle PB prédisent une influence minime de la température sur la contribution électrostatique au pK_{ap} ($-e\psi|_{r=a}/kT \ln 10$ dans Eq 4.12) (voir **Figure 4.5D**). Cette invariabilité du potentiel normalisé est le résultat de la variation particulière de la permittivité de l'eau, ϵ , en fonction de la température. La décroissance de ϵ avec la température résulte en une augmentation quasiment linéaire du potentiel électrostatique et le potentiel normalisé ($e\psi/kT$) est donc indépendant de la température.

Les valeurs de pK_0 obtenues par extrapolation linéaire de pK_{ap} (en utilisant les données dans la plage de α où le chitosane est soluble, i.e. $\alpha > 0.3$ à 0.6 selon f_D et c_{NaCl} , voir **Figure 4.4**), i.e. pK_0^{lin} , se situent entre 6.4 to 6.7 alors que celles obtenues du modèle PB, i.e. pK_0^{PB} , se situent entre 6.63 et 6.78. La gamme plus étendue de valeurs pK_0^{lin} est due au fait que l'extrapolation linéaire ne peut reproduire la convexité de la courbe $pK_{ap}(\alpha)$ observée et prédite par le modèle PB (**Figure 4.7**). Cette non-linéarité (convexité) du modèle PB est cependant éliminée en présence d'un excès de sel (150 mM) de telle sorte que pK_0^{lin} et pK_0^{PB} coïncident (**Figure 4.7**), se situant dans la plage

6.70 to 6.76, et sont de plus indépendants de f_D . Cette plage de valeurs pour le pK_0 du chitosane (6.70 to 6.76) concorde avec la valeur rapportée auparavant de 6.74, valeur obtenue par extrapolation à partir de titrages effectués sur des oligomères de chitosane de longueur croissante (Tsukada and Inoue 1981). Un avantage de cette méthode réside dans la solubilité des oligomères sur la plage entière du degré d'ionisation. Malgré cette concordance entre les valeurs de pK_0 trouvées ici et celles de Tsukada (Tsukada and Inoue 1981), il existe une variabilité considérable dans les valeurs de pK_0 rapportées dans la littérature allant de 6.0 à 9.0 (Tsukada and Inoue 1981; Domard 1987; Anthonsen and Smidsrod 1995; Rinaudo, Pavlov et al. 1999; Rinaudo, Pavlov et al. 1999; Sorlier, Denuziere et al. 2001; Strand, Tommeraas et al. 2001). Les deux études rapportant des valeurs de pK_0 du chitosane de l'ordre de 9 (Anthonsen and Smidsrod 1995; Strand, Tommeraas et al. 2001) ne sont pas conciliables avec nos résultats ni avec ceux de plusieurs autres études (Tsukada and Inoue 1981; Domard 1987; Rinaudo, Pavlov et al. 1999; Rinaudo, Pavlov et al. 1999; Sorlier, Denuziere et al. 2001) possiblement en raison d'une erreur de signe dans l'équation du pK_{ap} qui a été utilisée,

$$\text{i.e.} \quad pK_{ap} = pH - \log_{10} \left(\frac{\alpha}{1-\alpha} \right) \text{ (Anthonsen and Smidsrod 1995) } \quad \text{où}$$

$$pK_{ap} = pH + \log_{10} \left(\frac{1-\alpha}{\alpha} \right) \text{ (Strand, Tommeraas et al. 2001) } \quad \text{plutôt que}$$

$$pK_{ap} = pH + \log_{10} \left(\frac{\alpha}{1-\alpha} \right) \quad \text{où } \alpha \text{ est la fraction de monomère glucosamine protonée sur la}$$

chaîne. Nous estimons que la correction de cette erreur de signe dans ces deux études (Anthonsen and Smidsrod 1995; Strand, Tommeraas et al. 2001) résulterait en des

valeurs de pK_0 de l'ordre de 6.5 à 7.0. Deux autres études (Rinaudo, Pavlov et al. 1999; Rinaudo, Pavlov et al. 1999) rapportent une valeur du pK_0 du chitosane de 6.0 dans l'acide acétique et dans l'acide chlorhydrique. Cette valeur semble faible en comparaison à celles que nous avons trouvées. Cette valeur de 6.0 est possiblement inexacte en raison de l'utilisation de mesures de pH dans la zone de la courbe de titrage où le chitosane n'est que partiellement soluble, i.e. à faible degré d'ionisation. Notre plage de valeurs de pK_0 allant de 6.70 à 6.76 pour le chitosane en présence de 150 mM de NaCl est cependant relativement près des valeurs rapportées par Sorlier (Sorlier, Denuziere et al. 2001) et Domard (Domard 1987) qui ont trouvé des valeurs de pK_0 de 6.5 pour des chitosanes avec des valeurs de f_D similaires à celles que nous avons testées. Nous avons observé que le sel a une légère influence sur la valeur de pK_0^{PB} , les valeurs trouvées à $c_{NaCl} = 0$ et 15 mM étant inférieures d'environ ~ 0.1 unité que celles trouvées à $c_{NaCl} = 150$ mM (**Tableau 4.2**). Cependant, les pK_0^{PB} sont indépendants de f_D (**Tableau 4.2**) suggérant que les interactions intramoléculaires ont une influence négligeable sur le pK_0 . Une possible exception à cette dernière observation est le cas $f_D = 0.98$, $c_{NaCl} = 0$ mM pour lequel la valeur de pK_0^{PB} (6.78) est légèrement supérieure à celles trouvées pour les autres valeurs de f_D (**Tableau 4.2**). Soulignons cependant que les résultats du modèle PB avec $a = 1.3$ nm pour ce cas n'étaient pas aussi bons que pour les autres conditions (**Figure 4.4**). Rappelons que pour le cas $f_D = 0.98$, $c_{NaCl} = 0$ mM, on parvient à mieux reproduire les données expérimentales en utilisant une valeur plus grande du rayon du chitosane, $a = 1.5$ nm plutôt que 1.3 nm, et on trouve alors une valeur de pK_0 de 6.69 qui s'inscrit dans la tendance observée pour les autres conditions.

Un résultat nouveau présenté dans ce chapitre est l'influence marquée de la concentration du chitosane sur le pK_{ap} en absence de sel (**Figure 4.8**). Notons qu'aucune influence de la concentration du polymère n'est observée en présence d'un excès de sel (**Figure 4.8**). Ces effets de concentration sont bien prédits par le modèle PB (**Figure 4.8B**) et sont similaires à ceux rapportés précédemment par Nitta (Nitta and Sugai 1974) et par Katchalsky (Katchalsky, Shavit et al. 1954) pour d'autres polyélectrolytes. Cette influence de la concentration du chitosane sur le pK_{ap} devrait être considérée, en particulier lorsqu'on rapporte des valeurs de pK_{ap} pour des solutions de chitosane sans sel ajouté.

L'utilisation de l'équation de Poisson-Boltzmann dans la cellule cylindrique permet l'interprétation de tous les résultats reliés au pK_{ap} présentés dans ce chapitre. En utilisant une valeur de 1.3 nm pour le rayon du polyélectrolyte, le modèle PB prédit remarquablement bien l'influence de f_D , de c_{NaCl} et de la concentration de chitosane sur le pK_{ap} (**Figure 4.4**, **Figure 4.6** et **Figure 4.8**). Alors que le titrage de polyélectrolytes a été modélisé en utilisant diverses approches (Kotin and Nagasawa 1962; Cleland, Wang et al. 1982; Smits, Koper et al. 1993; Nishio 1994; Ullner, Joensson et al. 1996; Borukhov, Andelman et al. 2000) (voir Ullner 2002 pour une revue des différentes approches), nous avons utilisé une théorie du champ moyen basée sur l'application de l'équation de Poisson-Boltzmann dans la cellule cylindrique. La longueur de persistance du chitosane est de l'ordre de 10–15 nm (Anthonsen, Varum et al. 1993; Rinaudo, Milas

et al. 1993; Berth, Dautzenberg et al. 1998; Brugnerotto, Desbrieres et al. 2001; Schatz, Viton et al. 2003) suggérant que la chaîne de chitosane est suffisamment rigide (Mandel 1992) pour appliquer ce modèle. De plus, les sites chargés ne sont pas trop rapprochés et aucune indication de l'existence de fortes corrélations entre voisin proches n'est visible dans la courbe de titrage. Nous avons utilisé une valeur du rayon du cylindre impénétrable représentant le chitosane de 1.3 nm, valeur qui est supérieure à la valeur cristallographique qui est de 0.42 nm (Mazeau, Winter et al. 1994), mais qui est cependant plus appropriée puisque toutes les courbes de $pK_{ap}(\alpha)$ sont bien décrites avec $a = 1.3$ nm. Soulignons qu'il n'est pas rare qu'une valeur du rayon du polyélectrolyte supérieure à la valeur structurale soit utilisée dans le modèle PB cylindrique pour décrire les résultats de titrage. (Kotin and Nagasawa 1962; Nitta and Sugai 1974; Cleland, Wang et al. 1982). Par exemple, Cleland et al (Cleland, Wang et al. 1982), ont trouvé une valeur de 1 nm pour l'acide hyaluronique comparativement à la valeur attendue de l'ordre de 0.3 à 0.7 nm. Soulignons finalement que les résultats du modèle PB sont plus sensibles au choix de la valeur de a pour les cas sans sel ajouté, car c'est dans ces conditions que surviennent les valeurs les plus élevées du potentiel électrostatique.

Dans ce chapitre, nous avons étudié le comportement acide-base de chitosane ayant à la fois des valeurs différentes de f_D et de poids moléculaire. Idéalement, les chitosanes testés auraient eu la même poids moléculaire. Cependant, malgré cette différence de poids moléculaire, on peut supposer que les trois chitosanes testés sont suffisamment longs (longueur $> \sim 600$ monomères) de telle sorte que leur taille n'influence pas le

potentiel de surface du polymère dans un état soluble. Par contre, pour des chitosanes de même f_D , il est possible que le poids moléculaire influence la valeur de α à la précipitation, puisqu'on s'attend à ce que des chitosanes de poids moléculaire plus élevé précipitent à des valeurs de α plus élevées.

CHAPITRE 5: ARTICLE - HEAT-INDUCED TRANSFER OF PROTONS FROM CHITOSAN TO GLYCEROL PHOSPHATE PRODUCES CHITOSAN PRECIPITATION AND GELATION

5.1 Abstract

Recently, chitosan dissolved in solutions containing glycerol phosphate (GP) was found to undergo a sol-gel transition when heated and the proposed gelling mechanism was based on increasing hydrophobic interactions with temperature. Subsequently, an investigation of ionization and precipitation behavior of chitosan, including dependence on temperature, added salt, and fraction of deacetylated monomers (f_D) was performed. This latter study revealed important differences in the temperature dependence of pK_a of chitosan versus GP and led us to propose an alternative hypothesis for the mechanism of gelation in chitosan-GP systems whereby heat induces transfer of protons from chitosan to glycerol phosphate thereby neutralizing chitosan and allowing attractive inter-chain forces to form a physical gel. In order to investigate this specific molecular thermogelling mechanism, temperature ramp experiments on dilute chitosan-GP solutions were performed. Chitosans with f_D of 0.72 and 0.98 were used to prepare solutions with a range of molar ratios of GP to chitosan glucosamine monomer of 1.25 to 10 and with 0 or 150 mM added monovalent salt. Light transmittance measurements were performed simultaneously to indicate precipitation in these dilute systems as a surrogate for gelation in concentrated systems. Measured temperatures of precipitation ranged from 15 to 85°C, where solutions with less GP (used in a disodium salt form) had

lower precipitation temperatures. A theoretical model using acid-base equilibria with temperature dependent pK_a 's, including the electrostatic contribution from the polyelectrolyte nature of chitosan, was used to calculate the ionization degree of chitosan (α , the fraction of protonated glucosamine monomer) as a function of temperature and showed a significant decrease in α with increased temperature due to proton transfer from chitosan to GP. This heat-induced proton transfer from chitosan to GP was experimentally confirmed by ^{31}P NMR measurements during temperature ramp experiments since the chemical shift of ^{31}P of GP is an indicator of its level of protonation. By assuming average temperature independent values of α_p that were calculated from measured T_p , the model was able to accurately predict measured temperatures of precipitation (T_p) of all chitosan-GP mixtures. The resulting α_p were temperature independent but increased with increased chitosan f_D and with increased salt concentration. Measurements and theory revealed that T_p can be adjusted in a predictable manner by changing the chitosan/GP molar ratio and thereby systematically tailored to obtain a large range of precipitation temperatures. Finally, similar temperature ramp experiments using inorganic phosphate and MES in place of GP demonstrated that the temperature induced precipitation of chitosan also occurs with these buffers, confirming that the key feature of the buffer used with chitosan is its ability to absorb heat stimulated release of chitosan protons and facilitate chitosan neutralization. A theoretical expression for the variation of chitosan ionization degree with temperature in a system composed of two titratable species (chitosan and buffer) was derived and allowed us to establish the required characteristics of the buffer for efficient heat stimulated proton

transfer between a chitosan and the buffer. These results provide a useful explanation for the mechanism of heat induced gelation of chitosan-based systems that could be exploited for numerous practical applications.

5.2 Introduction

Chitosan is a cationic polysaccharide prepared by alkaline deacetylation of chitin that is found in the shells of crustaceans (Hoppe-Seyler 1894). It is a linear polyelectrolyte composed of glucosamine and N-acetyl-glucosamine monomers linked by β -(1 $\rightarrow$ 4) glycosidic bonds, where the fraction of monomers that are glucosamine is defined as f_D (fraction of deacetylated monomers). Chitosan has attracted attention in the pharmaceutical and biomedical fields since it possesses well known beneficial biological properties including biodegradability (Chenite, Chaput et al. 2000) and low toxicity (Knapczyk, Krowczynski et al. 1984; Hirano, Seino et al. 1990) and can be used in drug delivery, gene delivery (MacLaughlin, Mumper et al. 1998; Liu and Yao 2002; Lavertu, Methot et al. 2006), and wound healing (Muzzarelli, Mattioli-Belmonte et al. 1999; Ueno, Yamada et al. 1999). Chitosan is typically soluble only in acidic aqueous media when its degree of ionization, defined as the fraction of glucosamine monomers that are protonated, is sufficient to ensure that repulsive double layer forces dominate attractive forces and maintain the chitosan in solution. Recently, a thermo-sensitive gelling system based on chitosan solutions buffered with glycerol phosphate (Chenite, Chaput et al. 2000; Chenite, Buschmann et al. 2001) was discovered for use in regenerative medicine and has been successfully applied in combination with autologous blood to improve repair of lesions in articular cartilage (Hoemann, Hurtig et al. 2005). Nonetheless, a satisfactory understanding of the solution properties and thermo-sensitive characteristics of these chitosan/glycerol-phosphate (chitosan/GP) systems is lacking.

Previous studies speculated that the mechanism of thermogelation in chitosan/GP solutions was mainly the result of a strengthening of hydrophobic interactions with increasing temperature (Chenite, Chaput et al. 2000; Chenite, Buschmann et al. 2001; Cho, Heuzey et al. 2005). In particular the glycerol moiety of GP was proposed to have a structuring action on water (Chenite, Chaput et al. 2000) that was the main source of heat-induced strengthening of chitosan-chitosan hydrophobic interactions. Others have proposed a less specific increase in hydrophobicity with increasing temperature (Cho, Heuzey et al. 2005) while a previous report describing heat-induced gelation of hydrophobically modified chitosan (alkylated chitosan) (Desbrieres, Martinez et al. 1996) has also been cited as evidence of strengthening hydrophobic interactions with rising temperature in chitosan solutions. Nonetheless it should be noted that despite these studies mentioning increasing hydrophobicity with temperature in these systems, direct evidence for this mechanism specific to chitosan has not been presented. Additionally, although hydrophobic interactions between small apolar groups at low concentration in water are known to increase with temperature, this temperature dependence differs significantly for larger assemblies including macromolecules (Lum, Chandler et al. 1999, Huang and Chandler 2000). Yet others have observed that “the hydrophobic force can be used to rationalize virtually any unusual observations involving colloidal interparticle forces” (Tsao, Evans et al. 1993). Given this wide spectrum of opinion on the role of hydrophobicity in chitosan systems and the fact that chitosan itself does not present highly hydrophobic groups such as n-alkyl side chains

(Philippova, Volkov et al. 2001), we felt it prudent to examine other potential mechanisms of thermogelation in chitosan-GP solutions.

In a first study towards greater understanding of the mechanism behind thermogelation of chitosan-GP solutions, we examined the polyelectrolyte properties of chitosan, in particular the temperature dependence of ionization and precipitation of chitosan. This study revealed a significant decrease in chitosan pK_a with increasing temperature, by 0.023 units per $^{\circ}\text{C}$, while in contrast an almost negligible effect of temperature on the pK_a of GP was measured. Since the heat induced reduction of chitosan pK_a will release protons from chitosan and the temperature insensitive pK_a of GP should permit GP to accept these released protons, these observations led us to hypothesize a gelation mechanism whereby heating induces transfer of protons from chitosan to glycerol phosphate thereby neutralizing chitosan and allowing attractive chitosan-chitosan forces to dominate and form a physical gel (Filion 2005; Filion, Lavertu et al. 2007). In the current study, we tested this hypothesis by performing temperature ramp experiments on chitosan-GP solutions where chitosans with f_D of 0.72 and 0.98 were used in the presence of variable amounts of GP and with or without 150 mM added monovalent salt. Light transmittance and pH were measured during temperature ramps to indicate precipitation. In order to theoretically predict chitosan neutralization under heating in the presence of GP we also developed a model to calculate the degree of ionization of chitosan (α = the ratio of protonated glucosamine monomer to total glucosamine monomer) and its dependence on temperature in the

presence of GP. The model uses solution electroneutrality, acid-base equilibria of chitosan and GP, including their temperature dependent pK_a s, and a Poisson-Boltzmann cylindrical cell model to calculate the electrostatic component of chitosan pK_a . We specifically hypothesized that : 1) heating chitosan in the presence of GP would induce proton transfer from chitosan to GP and reduce the degree ionization of chitosan to a critical value, α_p , where repulsive chitosan-chitosan electrostatic forces could be overcome by attractive inter-chain forces and thereby induce chitosan precipitation; 2) for a given chitosan and ionic strength, α_p would not change significantly with temperature thus reflecting that total attractive interchain forces, that include hydrophobic forces, are not significantly affected by temperature. This hypothesis is motivated by the previous observation (Filion 2005; Filion, Lavertu et al. 2007) that degree of ionization at which precipitation of chitosan is initiated in titration experiments did not vary significantly with temperature. 3) increased ionic strength would dampen double layer repulsion via electrostatic screening and therefore increase the value of α_p . 4) α_p would also increase with increased f_D due to the known lower solubility of chitosans with high f_D (Varum, Ottoy et al. 1994; Filion, Lavertu et al. 2007). We also performed ^{31}P NMR experiments to directly assess heat induced proton transfer from chitosan to GP, since the chemical shift of ^{31}P in GP is ionization state dependent. Finally we examined the ability of two buffers that do not contain any glycerol moiety to replace GP and maintain thermogelling characteristics, to further confirm the fundamental mechanism of heat-induced gelation of chitosan-GP solutions as chitosan neutralization via proton transfer to a buffer with suitable pK_a characteristics.

5.3 Theory

We developed a model of chitosan-GP solutions that relates the temperature dependence of the degree of ionization of chitosan and solution pH to the temperature of precipitation of chitosan. The model used solution electroneutrality and acid-base equilibrium and explicitly accounted for temperature dependence. Since chitosan is a polyelectrolyte, its acid-base behaviour is more complex than for simple acid/base electrolytes since its pK_a depends on the surface electrostatic potential of this macroion. In a previous study (Filion, Lavertu et al. 2007), we developed the cylindrical cell model representation of chitosan in solution in the presence of an anionic counterion (Cl) and a monovalent salt (NaCl) and obtained the molecular electrostatic potential by solving the non-linear Poisson-Boltzmann equation within the cylindrical cell. In the current study this model was extended to permit the inclusion of a second titratable species in addition to chitosan, such as GP.

5.3.1 *Determination of $pH(T)$, degree of ionization of chitosan $\alpha(T)$ and temperature of precipitation T_p*

We consider a system composed of two weak electrolytes (chitosan and GP) and salt and apply acid-base equilibria and electroneutrality. The proton dissociation equilibrium of the glucosamine monomer of chitosan ($\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons \text{NH}_2 + \text{H}^+$) is described by (Marcus 1955; Fillion, Lavertu et al. 2007)

$$pK_{\text{ap}}(T) = \text{pH} + \log_{10} \left(\frac{c_g^+}{c_g^n} \right) = \text{pH} + \log_{10} \left(\frac{\alpha}{1-\alpha} \right) = pK_0(T) - \frac{e\psi|_{r=a}(T)}{kT \ln 10}$$

Eq 5.1

where pK_{ap} is the apparent proton dissociation constant of chitosan, c_g^+ and c_g^n are the concentration of ionized and neutral glucosamine monomer, respectively, $\alpha = c_g^+ / (c_g^+ + c_g^n) = c_g^+ / c_g$ is the degree of ionization of the polycation, $pK_0(T)$ is the intrinsic dissociation constant of the glucosamine monomer of chitosan (i.e. pK_{ap} when $\alpha = 0$) and $\psi|_{r=a}$ is the electrostatic potential at the surface of the polyelectrolyte in the Poisson–Boltzmann cylindrical cell model (see the next section below). Note that the cationic nature of the polyelectrolyte is seen in the rightmost term of Eq 5.1, $\frac{-e\psi|_{r=a}}{kT \ln 10}$. Proton dissociation equilibrium of GP is described by

$$pK_a^{\text{GP}}(T) = \text{pH} + \log_{10} \left(\frac{\bar{c}_{\text{GP}^+}}{\bar{c}_{\text{GP}^{2-}}} \right) = \text{pH} + \log_{10} \left(\frac{\chi}{1-\chi} \right)$$

Eq 5.2

where $\bar{c}_{\text{GP}^+}$ and $\bar{c}_{\text{GP}^{2+}}$ are the concentration of monovalent and divalent forms of GP, respectively and $\chi = \bar{c}_{\text{GP}^+} / (\bar{c}_{\text{GP}^+} + \bar{c}_{\text{GP}^{2+}}) = \bar{c}_{\text{GP}^+} / \bar{c}_{\text{GP}}$ is the fraction of GP in its acid (monovalent) form. The overbars are used to indicate average concentrations of mobile ions in the cylindrical unit cell introduced below. The dependence on temperature of the pK_a of both chitosan and GP can be well described by a polynomial of degree two (see Results section) such that the pK_a of chitosan and GP can also be written as:

$$\text{pK}_{\text{ap}}(T) = \text{pK}_0(T_0) + A_g(T - T_0) + B_g(T - T_0)^2 - \frac{e\psi|_{r=a}(T)}{kT \ln 10} \quad \text{Eq 5.3}$$

and

$$\text{pK}_a^{\text{GP}}(T) = \text{pK}_a^{\text{GP}}(T_0) + A_{\text{GP}}(T - T_0) + B_{\text{GP}}(T - T_0)^2 \quad \text{Eq 5.4}$$

where T_0 is an arbitrary reference temperature set to 25°C in this study, and A and B are constants determined from temperature ramp experiments by applying a previously developed relationship (Filion, Lavertu et al. 2007) between observed pH changes and pK_a changes :

$$\Delta \text{pK}_a(T) = \text{pK}_a(T) - \text{pK}_a(T_0) = \text{pH}(T) - \text{pH}(T_0) \quad \text{Eq 5.5}$$

We demonstrated previously that Eq 5.5 is valid for a weak acid HA (i.e. chitosan or

GP) of valence z ($\text{HA}^z \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{A}^{z-1}$) if $\frac{c_{\text{H}^+}}{c_{\text{HA}}} \ll 1$ and $\frac{c_{\text{OH}^-}}{c_{\text{HA}}} \ll 1$ and the ionization

state (α or χ) is not too close to 0 or 1 (Filion, Lavertu et al. 2007). Note that expressions analagous to Eq 5.5 are also valid when a parameter other than temperature is varied (e.g. concentration of added salt or concentration of the weak acid itself). Chitosan $pK_0(T_0)$ in Eq 5.3 values were obtained previously (Filion, Lavertu et al. 2007) while $pK_a^{GP}(T_0)$ in Eq 5.4 was obtained here in this study from titration experiments. The electrostatic contribution to pK_{ap} in Eq 5.1 and Eq 5.3 ($-\frac{e\psi|_{r=a}(T)}{kT \ln 10}$) was obtained by numerically solving the non-linear Poisson-Boltzmann equation within the cylindrical cell as a function of α , as described below.

In the context of this study, we consider 4 types of mobile ions, namely the counterions Cl^- (from the solvent HCl and NaCl salt added), GP^- and GP^{2-} and the coion Na^+ (from the dissociation of NaCl and GP that is used in a disodium salt form). When calculating electroneutrality, protons (H^+) and hydroxyl ion (OH^-) were neglected since only neutral or near neutral solutions are considered. The condition of macroscopic electroneutrality is then given by:

$$\bar{c}_{\text{Cl}} + \bar{c}_{\text{GP}^-} + 2\bar{c}_{\text{GP}^{2-}} - \bar{c}_{\text{Na}} - c_g^+ = 0$$

Eq 5.6

Total chloride ion concentration is $\bar{c}_{\text{Cl}} = \bar{c}_{\text{HCl}} + \bar{c}_{\text{NaCl}}$ and since GP is a disodium salt, total sodium concentration is $\bar{c}_{\text{Na}} = 2\bar{c}_{\text{GP}} + \bar{c}_{\text{NaCl}}$, and total GP is $\bar{c}_{\text{GP}} = \bar{c}_{\text{GP}^-} + \bar{c}_{\text{GP}^{2-}}$ such that Eq 5.6 can be simplified to

$$\bar{c}_{\text{HCl}} - \bar{c}_{\text{GP}^-} - c_g^+ = 0 \text{ or } 1 - r\chi - \alpha = 0$$

Eq 5.7

where r is the ratio of total GP to total glucosamine (i.e. $r = \frac{\bar{c}_{\text{GP}}}{c_g}$). Eq 5.7 assumes a 1:1

ratio of total glucosamine monomer : HCl as is the case for solutions tested in the current study. $\text{pH}(T)$ and $\alpha(T)$ were calculated by numerically solving Eq 5.1, Eq 5.2 and Eq 5.7 simultaneously with the pK_a temperature dependencies of Eq 5.3 and Eq 5.4.

Note that the electrostatic contribution to the pK_{ap} of chitosan, $\frac{-e\psi|_{r=a}}{kT \ln 10}$ in Eq 5.1, was

calculated by solving the Poisson-Boltzmann equation (see next section) prior to solving

Eq 5.1, Eq 5.2, Eq 5.3, Eq 5.4 and Eq 5.7. In particular, $\frac{-e\psi|_{r=a}}{kT \ln 10}$ was calculated for α values ranging from 0 to 1 (adjusted by varying χ , i.e. proportions of GP^- and GP^{2-} , in Eq 5.7) for all experimental conditions of f_D , r , and c_{NaCl} . Alternatively, the temperature of precipitation T_p could be estimated by solving this same system of equations after setting α to its value at precipitation (α_p).

5.3.2 The cylindrical cell model and the Poisson-Boltzmann equation

This model for chitosan in solution at finite concentration is an extension of a model described in a previous publication (Filion, Lavertu et al. 2007), by further including here the presence of a second weak electrolyte, namely GP, in addition to chitosan. As in the previous study, chitosan is represented as an infinitely long impermeable cylinder of radius $a = 1.3$ nm where discrete charge sites are smeared out to form a uniform surface charge density σ ,

$$\sigma = \frac{e\alpha f_D}{2\pi la}$$

Eq 5.8

where e is the elementary charge and l is the length of the monomer that is set to $l = 0.52$ nm following structural data (Mazeau, Winter et al. 1994; Okuyama, Noguchi et al. 1997). Each polymer chain is located at the center of a cylindrical cell whose radius b is

determined from the monomer concentration c_p (including both glucosamine and *N*-acetyl-glucosamine) and monomer length l , according to

$$b = \left(\frac{1}{\pi l c_p N_A} \right)^{1/2}$$

Eq 5.9

where N_A is Avogadro's number. The polycation is surrounded by mobile ions in the region $a < r < b$ that are assumed to follow a Boltzmann distribution at equilibrium, resulting in a concentration profile $c_i(r)$ for mobile ion i about the polyion that is a function of radial position r and electrostatic potential $\psi(r)$,

$$c_i(r) = c_i^0 e^{-\frac{z_i e \psi(r)}{kT}}$$

Eq 5.10

where z_i is the valence of the mobile ion i and k is Boltzmann's constant. The value of c_i^0 is related to the mean concentration of positive and negative electrolyte ions, $\bar{c}_i$, in the volume of the cylindrical cell according to:

$$\bar{c}_i = c_i^0 \frac{\int_a^b 2\pi r e^{-\frac{z_i e \psi(r)}{kT}} dr}{b^2} = \frac{c_i^0}{\gamma_i}$$

Eq 5.11

where $\bar{c}_i$ is the mean concentration of mobile ion i , and $\gamma_i = b^2 \int_a^b 2\pi r e^{-\frac{z_i e \psi(r)}{kT}} dr$ is the mobile ion activity coefficient in the cylindrical cell and $\gamma_i \bar{c}_i = c_i^0$ is the ion activity

($a_i = \gamma_i \bar{c}_i = c_i^0$) as derived previously (Marcus 1955) for this particular mean-field theory.

The electrostatic potential, $\psi(a < r < b)$, can be found from the solution to the Poisson–Boltzmann equation (Fixman 1979; Carnie and Torrie 1984; Buschmann and Grodzinsky 1995) in cylindrical coordinates,

$$\frac{d^2\psi(r)}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d\psi(r)}{dr} = -\frac{\rho(r)}{\epsilon} = -\frac{\sum_i z_i e c_i^0 e^{-\frac{z_i e \psi(r)}{kT}}}{\epsilon}$$

Eq 5.12

subject to boundary conditions from Gauss' law

$$\left. \frac{d\psi(r)}{dr} \right|_{r=a} = -\frac{\sigma}{\epsilon} = -\frac{e\alpha f_D}{2\pi a l \epsilon} \quad \text{and} \quad \left. \frac{d\psi(r)}{dr} \right|_{r=b} = 0$$

Eq 5.13

where ϵ is the permittivity of water, $\rho(r)$ is the spatially varying charge density and c_i^0 is an arbitrary reference concentration for mobile ion i . The solution to Eq 5.12 must also satisfy known average ion concentrations in Eq 5.11. In order to facilitate numerical solution of Eq 5.12, we choose to equate total monovalent counter-ion and co-ion activities,

$$c_{\text{Cl}}^0 + c_{\text{GP}}^0 = c_{\text{Na}}^0 = c^0$$

Eq 5.14

which simply implies a particular value of reference potential, as demonstrated in (Filion, Lavertu et al. 2007). Note that Cl^- and GP^- can be grouped together as they are

both monovalent anions following the same Boltzmann distribution. Eq 5.12 can then be rewritten using Eq 5.14, to obtain

$$\frac{d^2\psi(r)}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d\psi(r)}{dr} = \frac{2ec^0}{\varepsilon} \sinh\left(\frac{e\psi(r)}{kT}\right) + \frac{2ec_{GP^{2-}}^0}{\varepsilon} e^{+\frac{2e\psi(r)}{kT}}$$

Eq 5.15

For a given α that defines the polyelectrolyte surface charge σ according to Eq 5.8, and a given polyelectrolyte monomer concentration c_p , that defines the outer cell radius b according to Eq 5.9, we numerically solved Eq 5.15 such that the boundary conditions of Eq 5.13 were satisfied. Initial guesses for c^0 and $c_{GP^{2-}}^0$ were taken and the solution was then iterated until the right-hand side of Eq 5.11 converged to the experimentally known average ion concentrations of c_{Cl} , c_{Na} , and total GP $c_{GP} = c_{GP^-} + c_{GP^{2-}}$. In this way the Poisson-Boltzmann equation was solved for a closed volume of polyelectrolyte solution at finite concentration that is not in equilibrium with an external bath (Filion, Lavertu et al. 2007). In all tested solutions, HCl and glucosamine monomer were present in equal amounts so that α was varied from 0 to 1 by varying c_{GP^-} from 0 to c_{HCl} according to Eq 5.7. The numerically obtained solution for $\psi(r)$ was finally adjusted by subtracting $\psi(b)$ from it in order to redefine the reference potential as $\psi(b) = 0$ which has no physical consequence, but conforms to the reference potential used to derive Eq 5.1 (see Appendix I in (Filion, Lavertu et al. 2007)). Once $\psi(r=a)$ is known then the electrostatic contribution to the pK_{ap} (rightmost term of Eq 5.1) was calculated at 25°C

and this value was used for all temperatures due to the temperature independence of the normalized potential in the PB model as shown previously (Filion, Lavertu et al. 2007).

5.3.3 The influence of temperature on the degree of ionization of chitosan in chitosan-GP solutions

For chitosan-GP mixtures, there is no analytical solution for $\alpha(T)$ or $\text{pH}(T)$ since the $\text{p}K_a$ of chitosan depends on the charge state of the macroion so that the numerical solution described above is required. However, the following analytical expression for the variation of α with temperature can be derived (Appendix I) :

$$\frac{d\alpha}{dT} = \frac{\ln 10 \left(\frac{dpK_0}{dT} - \frac{dpK_{GP}}{dT} \right)}{\left(\frac{1}{\alpha(1-\alpha)} + \frac{1}{r} \times \frac{1}{\chi(1-\chi)} + m \ln 10 \right)}$$

Eq 5.16

where r is the ratio of total GP to total glucosamine ($\bar{c}_{GP}/c_g$) and m is the slope of a linear approximation of $\text{p}K_{ap}$ ($\text{p}K_{ap}(T) \approx \text{p}K_0(T) - m\alpha$) that was used to derive Eq 5.16. We demonstrated previously that this linearized form of $\text{p}K_{ap}$ is a good approximation, especially in the presence of added salt or for low values of α (Filion, Lavertu et al. 2007). Note also that m is positive for a cationic polyelectrolyte such as chitosan and

that $m = 0$ in Eq 5.16 for simple acid/base electrolytes. Since α and χ range from 0 to 1 and m and r are positive, we see from Eq 5.16 that $\frac{dpK_0}{dT} < \frac{dpK_{GP}}{dT}$ is required in order that $\frac{d\alpha}{dT} < 0$ thus indicating that the macroion is neutralized upon heating. Eq 5.16 predicts a significant rate of variation of the charge state when $\left| \frac{dpK_0}{dT} - \frac{dpK_{GP}}{dT} \right|$ as well as $r = \frac{\bar{c}_{GP}}{c_g}$ have high values and when m is small (i.e. for the case of significant added salt that reduces the electrostatic contribution to chitosan pK_{ap}). Another condition required to attain a significant variation of chitosan charge state upon heating is that α and χ are not too close to 0 or 1, meaning that pK_a of the two buffers must be similar. If the pK_a of the buffer is greatly different from the chitosan pK_{ap} , then Eq 5.16 would require a high value of $r = \frac{\bar{c}_{GP}}{c_g}$ to induce precipitation since for high values of r , an excess of proton acceptor (GP) is needed for chitosan neutralization. The influence of m on $d\alpha/dT$ arises from the increasing pK_{ap} as the degree of ionization is decreased ($pK_{ap}(T) \approx pK_0(T) - m\alpha$) which opposes the decrease in pK_{ap} induced when temperature rises. This latter effect is dampened in the presence of added salt where the pK_{ap} varies less with α and m is reduced. The relationship between α and χ in Eq 5.7 can be inserted into Eq 5.16 to obtain:

$$\frac{d\alpha}{dT} = \frac{\ln 10 \left(\frac{dpK_0}{dT} - \frac{dpK_{GP}}{dT} \right)}{\left(\frac{1}{\alpha(1-\alpha)} + \frac{r}{(1-\alpha)(r+\alpha-1)} + m \ln 10 \right)} \quad \text{with } r+\alpha-1 > 0$$

Eq 5.17

For sufficiently high values of $r = \frac{\bar{c}_{GP}}{c_g}$ (i.e $r \gg 1 - \alpha$) Eq 5.16 then reduces to

$$\frac{d\alpha}{dT} \approx \ln 10 \frac{\left(\frac{dpK_0}{dT} - \frac{dpK_{GP}}{dT} \right)}{\left(\frac{1+\alpha}{\alpha(1-\alpha)} + m \ln 10 \right)}$$

Eq 5.18

and is independent of the amount of GP used. Note that since $r+\alpha-1 > 0$, the minimal value of α is $1-r$ and α must be reduced below α_p in order to observe precipitation. Therefore, a chitosan-GP solution with $r < 1 - \alpha_p$ cannot undergo precipitation, according to our hypothesis.

5.3.4 Determination of changes in chitosan degree of ionization $\alpha(T)$ by ^{31}P NMR.

The chemical shift of ^{31}P of GP is sensitive to its ionization state. If δ_a and δ_b are the chemical shifts of GP in its acid form (GP^-) and base form (GP^{2-}) respectively, then its measured chemical shift δ , at arbitrary charge state χ is the weighted average

$$\delta = \chi\delta_a + (1 - \chi)\delta_b \Rightarrow \chi = \frac{\delta_b - \delta}{\delta_b - \delta_a}$$

Eq 5.19

and the following relation can be obtained from Eq 5.2 and Eq 5.19

$$\delta = \delta_b - \frac{(\delta_b - \delta_a)}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_a^{\text{GP}}}}$$

Eq 5.20

δ_a , δ_b and $\text{p}K_a^{\text{GP}}$ were determined by fitting the above equation to ^{31}P NMR data acquired at controlled temperatures with GP solutions that were titrated with HCl to specific charge states χ . There are only two protonatable species (chitosan and GP) in solution, such that Eq 5.7 indicates that changes in χ directly reflect changes in α . Therefore $\alpha(T)$ may be calculated by measuring χ from ^{31}P NMR at any temperature and using the following equation that results from combining Eq 5.7 with Eq 5.19:

$$\alpha(T) = 1 - r\chi(T) = 1 - r \left(\frac{\delta_b(T) - \delta(T)}{\delta_b(T) - \delta_a(T)} \right)$$

Eq 5.21

Here again Eq 5.21 assumes a 1:1 ratio of total glucosamine monomer : HCl as is the case for solutions tested in the current study.

5.4 Experimental Methods

5.4.1 Reagents and solutions

Ultrapure chitosans with f_D of 0.72 and 0.98 were provided by BioSyntech (**Tableau 5.1**). HCl 1 N (Aldrich, Cat No. 31,894-9) was used to dissolve chitosan. Chitosan solutions with precise concentration were prepared from powders dried at 60 °C for 2 days using a heated centrifugal vacuum concentrator (Savant Speedvac, model SS110) prior to dissolution.

Tableau 5.1. Chitosans.

f_D	M_n^a (kDa)	PDI ^b
0.72	553	2.3
0.98	103	1.6

^aNumber average molecular weight (M_n) by triple detector gel permeation chromatography (Brugnerotto, Desbrieres et al. 2001) (GPC) and ^b polydispersity index ($PDI = M_w/M_n$) using weight average molecular weight (M_w) obtained by GPC, both provided by the manufacturer.

For all experiments, chitosan was dissolved to obtain 3 mM concentration of its glucosamine monomer in a 500 mL volumetric flask and HCl added to a molar ratio of

HCl : glucosamine of 1:1 resulting in a pH of about 4. To make these solutions, dried chitosan was added to de-ionized water, stirred to disperse the powder prior to adding HCl and then stirred overnight to ensure complete dissolution. Glycerol disodium salt (GP) (Sigma Cat # G9891) stock solutions were prepared in volumetric flasks at concentrations varying from 3.75 to 30 mM. Chitosan-GP mixtures used in temperature ramp experiments were made by mixing equal volumes of chitosan and GP stock solutions, such that the final concentration of chitosan was always 1.5 mM of total glucosamine monomer. Solutions with different molar ratios of GP to total chitosan glucosamine ($r = \bar{c}_{GP}/c_g$) ranging from 1.25 to 10 were achieved by varying the concentration of GP stock solution. Salt concentration in these solutions was adjusted by adding appropriate amount of NaCl 5N. Chitosan-GP mixtures to be tested in ^{31}P NMR experiments were prepared as above with 10% v/v deuterium oxide (Sigma Cat # 15188). Disodium phosphate (Sigma Cat # S5136) or 4-morpholineethanesulfonic acid (MES) (Sigma Cat # M5287) were also used as buffers to replace GP in chitosan-GP mixtures and create thermogelling solutions. Disodium phosphate was prepared at 5 mM. MES was prepared at 15 mM with a molar ratio of MES:NaOH = 1:1. They were mixed with chitosan as described above for GP prior performing temperature ramp experiments.

5.4.2 pK_a measurements and temperature ramp experiments

A custom apparatus described previously (Filion, Lavertu et al. 2007) allowed simultaneous measurement of pH and laser light relative transmittance (L_T), the latter

used to detect precipitation of chitosan-GP solutions in ramp temperature experiments. For all experiments, solutions were continuously stirred inside a 50 mL reaction jacketed beaker (Kontes, Cat. No. 317000-0050) with the jacket coupled to a heating circulating bath (Neslab, model RT-111) to control temperature via an Automatic Temperature Compensation (ATC) probe (Accumet, Fisher Scientific catalog No. 13-620-16) immersed in the tested solution. The pH electrode (Orion, model No. 8115 connected to the Accumet, Model 20 pH meter) was calibrated with NIST standards at room temperature and the automatic ATC probe corrected for the temperature dependence of the pH electrode. To detect chitosan precipitation, laser light relative transmittance, L_T , was measured throughout the experiment by passing a 635-nm diode laser beam (Coherent, 5 mW, 31-0128) through the solution and walls of the beaker with detection by a photo detector (Coherent, Laser-Q VIS, 33-0241 connected to a multimeter Fluke, model 45 Dual display). The temperature of precipitation (T_p) was determined as the intercept of the extrapolated transmittance (L_T) baseline and the extrapolation of the linearly decreasing section of the transmittance (see **Figure 5.1**). The corresponding value of α at which these L_T decreased to indicate precipitation, called α_p , was calculated as described in the theory section. The computer controlled the titration burette and bath temperature in addition to acquiring pH, temperature and L_T data.

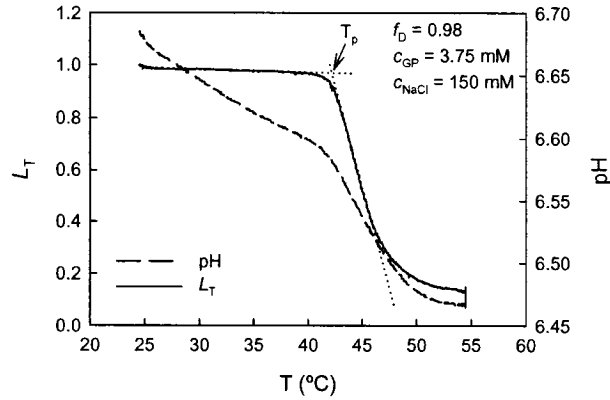


Figure 5.1. Laser transmittance (L_T) and pH during a temperature ramp ($1^\circ\text{C}/\text{min}$) of a chitosan-GP solution ($c_g = 1.5 \text{ mM}$, $r = \bar{c}_{\text{GP}}/c_g = 2.5$). The temperature of chitosan precipitation (T_p) was found as the intercept of the extrapolated transmittance (L_T) baseline before precipitation with the extrapolated transmittance (L_T) after precipitation. The pH showed a similar decrease at precipitation, likely due to increased charge density local to chitosan aggregation that promoted proton release to a greater extent than that predicted from the $\text{p}K_a$ variation with temperature of soluble chitosan.

We also used this apparatus to measure the $\text{p}K_a$ of GP and of chitosan. $\text{p}K_a^{\text{GP}}$ at 25°C was obtained by titrating 20 mL of GP at $c_{\text{GP}} = 25 \text{ mM}$ using an automatic burette (Schott, Titronic Universal 20 mL) to add 0.1 mL increments of 0.25 N HCl every 30 seconds. The measured pH was then fit to Eq 5.2 to determine $\text{p}K_a^{\text{GP}}(25^\circ\text{C})$ after calculating χ from electroneutrality, $\bar{c}_{\text{Cl}} + \bar{c}_{\text{GP}^-} + 2\bar{c}_{\text{GP}^{2-}} - \bar{c}_{\text{Na}} = 0$, and total GP $\bar{c}_{\text{GP}} = \bar{c}_{\text{GP}^-} + \bar{c}_{\text{GP}^{2-}}$ for each data point during titration. The $\text{p}K_a^{\text{GP}}$ for other conditions (different c_{GP} or different c_{NaCl}) was calculated from pH measurements after dilution or

addition of NaCl according to Eq 5.5 and using the pK_a value found at $c_{GP} = 25$ mM, $c_{NaCl} = 0$ mM, $T = 25^\circ\text{C}$ as a reference. Chitosan $pK_0(T_0)$ were previously measured (Filion, Lavertu et al. 2007) and chitosan pK_{ap} was obtained from Eq 5.1 and using the Poisson Boltzmann model described above. Variation of the pK_a of chitosan and GP with temperature was calculated from pH changes in temperature ramps from 5 to 85°C according to Eq 5.5.

5.4.3 ^{31}P NMR

^{31}P NMR spectra were acquired on a Bruker BioSpin Avance 500 MHz using a 5 mm broadband probe (BBO). The ^{31}P NMR experiment for measuring the chemical shift of GP was a single pulse sequence of 30° . The delay before the application of the pulse was 2 seconds and the acquisition time was 1.6 seconds. The spectral width was 20161 Hz, the number of data points was 64k. The number of acquired transients was 8 and 64 for GP and chitosan-GP mixtures, respectively. ^{31}P spectra of GP solutions (5 mM) containing 10% v/v of deuterium oxide and titrated with HCl to a specific charge state χ were acquired at controlled temperatures ranging from 5 to 55°C at 10°C intervals. These solutions were used to establish the values of δ_a and δ_b as a function of temperature using Eq 5.20. ^{31}P spectra of chitosan-GP mixtures prepared as described above were also acquired at controlled temperatures ranging from 5 to 55°C at 10°C intervals and chitosan degree of ionization, $\alpha(T)$, was calculated using Eq 5.21.

5.5 Results

5.5.1 Influence of temperature on GP pK_a^{GP} and chitosan pK_{ap}

The GP pK_a^{GP} was found to increase slightly with temperature from 5 to 85°C (Figure 5.2) while the pK_{ap} of chitosan was found to decrease significantly with temperature (Figure 5.2) as previously reported (Filion, Lavertu et al. 2007). We demonstrated previously (Filion, Lavertu et al. 2007) that this temperature dependence of chitosan pK_{ap} is the result of its intrinsic pK_0 changing with temperature since the right most electrostatic term of Eq 5.3 was found to be temperature independent.

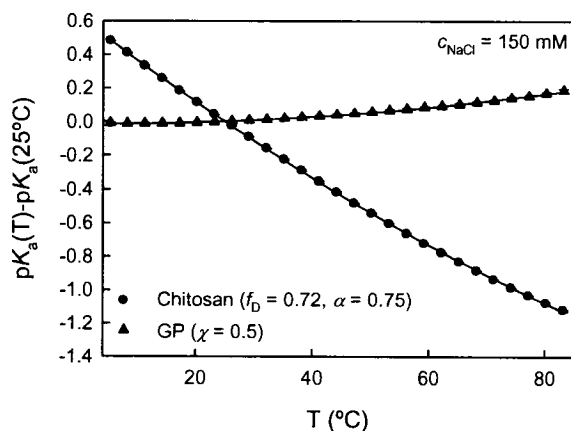


Figure 5.2. Variation of the pK_a 's of chitosan and GP with temperature (mean $\pm$ min/max, $n = 2$) in a ramp test (1°C/min). The chitosan solution had $\alpha = 0.75$ and the GP solution had $\chi = 0.5$ with $c_{\text{NaCl}} = 150$ mM for both. Polynomials of degree 2 (Eq 5.3 and Eq 5.4) were fit to the data and are shown as solid lines. The resulting best fit parameters

were $A_g = -2.32 \times 10^{-2}$ and $B_g = 6.57 \times 10^{-5}$ in Eq 5.4 for chitosan and $A_{GP} = 1.36 \times 10^{-3}$ and $B_{GP} = 3.04 \times 10^{-5}$ in Eq 5.5 for GP both with reference temperature $T_0 = 25^\circ\text{C}$.

5.5.2 Influence of GP concentration c_{GP} and salt concentration c_{NaCl} on pK_a^{GP}

The pK_a of GP was found to vary with its own concentration and with the concentration of added salt (**Tableau 5.2**). The pK_a^{GP} of the solution with $c_{GP} = 25 \text{ mM}$ was obtained by potentiometric titration, while additional pK_a^{GP} values were obtained by diluting this solution or by adding NaCl and using the pK_a^{GP} obtained with $c_{GP} = 25 \text{ mM}$ and $c_{NaCl} = 0 \text{ mM}$ as a reference in Eq 5.5. We found that the pK_a of GP decreased when either its concentration c_{GP} increased in the absence of added salt, or when salt concentration c_{NaCl} increased at constant c_{GP} (**Tableau 5.2**), since augmented electrostatic screening will more easily permit separation of protons from the negatively charged GP^{2-} .

Tableau 5.2. Variation of pK_a^{GP} with concentration c_{GP} and salt c_{NaCl} at $T = 25^\circ\text{C}$

		pK_a^{GP}	
		$c_{NaCl} = 0 \text{ mM}$	$c_{NaCl} = 150 \text{ mM}$
$c_{GP}(\text{mM})$	24	6.38	6.18
	12	6.45	6.19
	6	6.50	6.20
	3	6.54	6.21
	1.5	6.58	6.21

5.5.3 Calculation of chitosan pK_{ap} from PB model

Theoretical predictions of chitosan $pK_{ap}(\alpha)$ using Eq 5.1 (the rightmost version) and the PB model described in the theory section were obtained for all performed temperature ramp experiments (**Figure 5.3**). We used previously obtained values of $pK_0(25^\circ\text{C})$ of 6.63 at $c_{NaCl} = 0$ and 6.73 at $c_{NaCl} = 150 \text{ mM}$ in Eq 5.1, that were independent of f_D , and then calculated the electrostatic term $\frac{-e\psi|_{r=a}(T)}{kT \ln 10}$ using the PB model, as described respectively (Filion, Lavertu et al. 2007). As expected, increasing c_{GP} or c_{NaCl} increased chitosan pK_{ap} via electrostatic screening. Theoretical results predict that the pK_{ap} varies with α in a linear fashion when $\alpha < 0.4$ (**Figure 5.3**). Calculations performed at varying temperatures did not reveal any significant

temperature-dependent changes in the electrostatic contribution to $pK_{ap}(\alpha)$, namely the rightmost term in Eq 5.1 $\frac{-e\psi|_{r=a}(T)}{kT \ln 10}$ (data not shown). This latter result has been previously observed (Filion, Lavertu et al. 2007) and ascribed to the temperature independence of the normalized potential, $(e\psi/kT)$, in Eq 5.1 that is itself due to the water permittivity linearly decreasing with temperature and thereby linearly increasing ψ , which after normalization as $(e\psi/kT)$ becomes temperature independent.

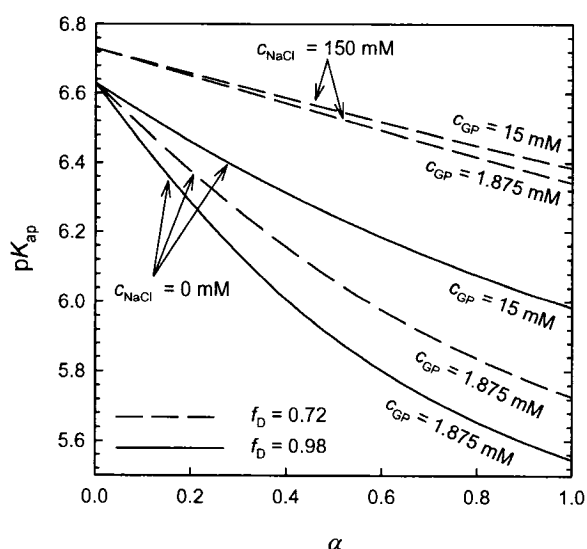


Figure 5.3. Theoretical dependence of chitosan pK_{ap} at constant temperature (25°C) on the degree of ionization, α , for certain combinations of f_D , c_{GP} and c_{NaCl} . These PB model results were obtained using $c_g = 1.5$ mM, $a = 1.3$ nm (polyelectrolyte radius) and $l = 0.52$ nm (charged sites spacing on the chain).

5.5.4 *Temperature dependence of pH of chitosan-GP mixtures*

In order to investigate the accuracy of the PB model the theoretically predicted pH of chitosan-GP mixtures was compared to experimental measurements. We found the pH of chitosan-GP solutions with 150 mM added salt to be lower than that without added salt, consistent with the observed decrease of pK_a^{GP} (~ 0.3 points in **Tableau 5.2**) dominating the increase in chitosan pK_{ap} (~ 0.1 points) due to the greater concentration of GP versus glucosamine monomer in most of the tested chitosan-GP solutions. In general, the model and experiments closely agreed, the theoretical pH being within ± 0.07 units of the experimental pH for all conditions tested (see Figure 5.4 for a few examples).

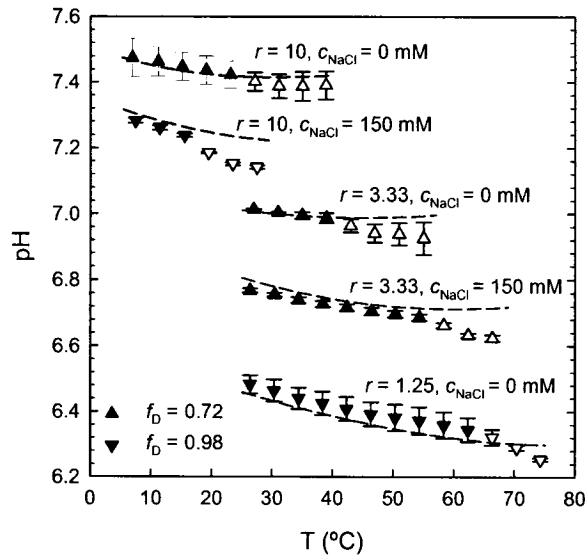


Figure 5.4. Experimental pH(T) (symbols) compared to theoretical pH (lines) vs temperature for various chitosan/GP mixtures ($c_g = 1.5$ mM) where $r = \bar{c}_{GP}/c_g$, subjected to ramp tests at $1^\circ\text{C}/\text{min}$. Open white symbols correspond to values obtained after chitosan precipitation.

We found that measured pH during temperature ramps decreased more slowly with temperature than the calculated pK_{ap} which was consistent with heat-induced progressive neutralization of the macroion, according to Eq 5.1. For example, the difference, $\Delta = \text{pH}(T) - pK_{ap}(T)$, in a solution of chitosan with $f_D = 0.75$ with $c_g = 1.5$ mM, $c_{GP} = 10$ mM and $c_{NaCl} = 150$ mM, was $\Delta = 0.21$ at 10°C but $\Delta = 0.44$ at 25°C (**Figure 5.5**). The degree of ionization, α , can be calculated from Eq 5.1 as $\alpha = \frac{1}{1+10^\Delta}$ resulting in $\alpha = 0.38$ at

10°C while a reduced $\alpha = 0.27$ at 25°C, corresponding to a decrease of about 30% within heating by only 15°C.

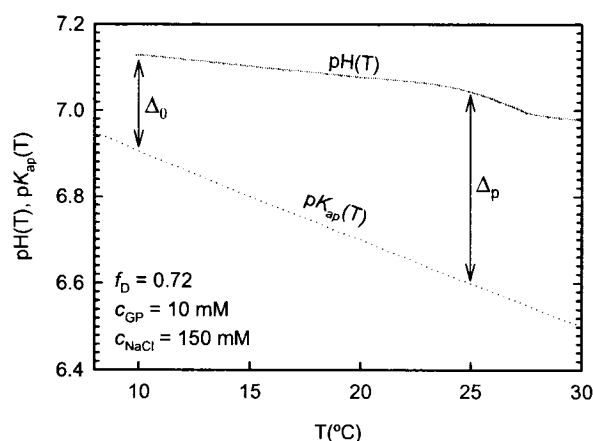


Figure 5.5. Different slopes of experimentally measured pH of chitosan-GP and theoretically calculated chitosan pK_{ap} vs temperature indicate decreasing degree of ionization of chitosan during this temperature ramp. The degree of chitosan ionization, α , can be calculated from Eq 5.1 as $\alpha = \frac{1}{1+10^{\Delta}}$ where $\Delta = pH(T) - pK_{ap}(T)$ is specifically indicated as $\Delta(10^{\circ}\text{C}) = 0.21$ and as $\Delta(25^{\circ}\text{C}) = 0.44$ to provide $\alpha = 0.38$ at 10°C and a reduced $\alpha = 0.27$ at 25°C. In this case precipitation occurs at 25°C and is indicated by an abrupt change in slope of measured pH vs T. This accelerated decrease of pH is not reflected in the calculated pK_{ap} since the latter assumes a soluble macroion in homogeneous equilibrium with respect to proton dissociation. On the contrary, chitosan precipitation will condense chitosan to increase local charge density thus reducing pK_{ap} and expelling protons from chitosan.

5.5.5 Proton transfer from chitosan to GP monitored by ^{31}P NMR

In order to experimentally investigate the theoretically predicted change of the degree of ionization of chitosan upon heating, we monitored the ^{31}P chemical shift of GP as a function of temperature in GP solutions and in chitosan-GP mixtures. In order to establish the link between the ^{31}P chemical shift (δ) of GP and its degree of association χ , we obtained δ vs pH for solutions of GP 5 mM with $c_{\text{NaCl}} = 150$ mM titrated to specific χ values. $\delta_a(T)$, $\delta_b(T)$ and $\text{p}K_a^{\text{GP}}(T)$ were then determined by fitting the Eq 5.20 to ^{31}P NMR data acquired at controlled temperatures ranging from 5 to 55°C (Figure 5.6 A). We then performed ramp temperature experiments on two chitosan-GP mixtures with $c_{\text{NaCl}} = 150$ mM and found that upon heating, the ^{31}P chemical shift of chitosan-GP mixtures approached the chemical shift of the acidic form of GP, $\delta_a(T)$, for both solutions, indicating that the ratio of monovalent GP^- to divalent GP^{2-} in these solutions increased with temperature by abstracting protons from chitosan and thereby progressively neutralizing chitosan (Figure 5.6 B; note that α decreases when χ increases according to Eq 5.7 or Eq 5.21). Eq 5.21 was then used to calculate chitosan degree of ionization $\alpha(T)$ from NMR data and compared to theoretical predictions obtained by solving Eq 5.1, Eq 5.2, Eq 5.3, Eq 5.4 and Eq 5.7 (Figure 5.6 C). The reasonable agreement between theory and experiment confirms a significant transfer of protons from chitosan to GP upon heating. For example, for the solution with $f_D = 0.72$, $c_g = 1.5$ mM, $c_{\text{GP}} = 5$ mM and $c_{\text{NaCl}} = 150$ mM, α changes from ~ 0.6 to 0.2 upon heating from 5 to 55°C, a reduction of about 67% while for the solution with $f_D = 0.98$, $c_g = 1.5$

mM, $c_{\text{GP}} = 2$ mM and $c_{\text{NaCl}} = 150$ mM, α changes from ~ 0.7 to 0.3 upon heating from 5 to 55°C, a reduction of about 57%.

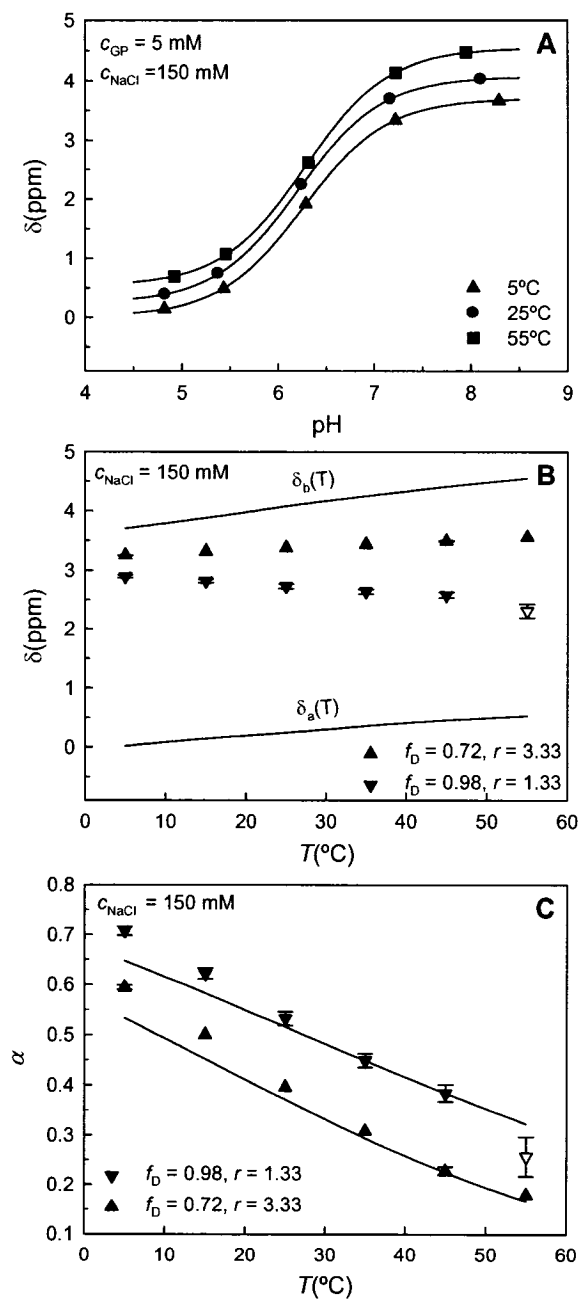


Figure 5.6. Chitosan degree of ionization from ^{31}P NMR. A) Measured ^{31}P chemical shift of GP vs pH (symbols) and best fits of Eq 5.20 to data resulting in ($\delta_a = 0.017$, $\delta_b =$

3.704, $pK_a = 6.26$) at 5°C, ($\delta_a = 0.243$, $\delta_b = 4.074$, $pK_a = 6.21$) at 25°C and ($\delta_a = 0.530$, $\delta_b = 4.551$, $pK_a = 6.28$) at 55°C for $c_{GP} = 5$ mM and $c_{NaCl} = 150$ mM. B) Temperature dependence of ^{31}P chemical shift of GP (symbols, mean $\pm$ min/max, $n=2$) for two chitosan-GP solutions both with $c_g = 1.5$ mM, $c_{NaCl} = 150$ mM compared to the chemical shifts of the pure acid form $\delta_a(T)$ and base form $\delta_b(T)$. Upon heating, the ^{31}P chemical shift of the chitosan-GP mixtures approaches $\delta_a(T)$ for both solutions, indicating that the proportion of GP^- vs GP^{2-} in the solution increases with temperature by taking protons from chitosan that is progressively neutralized (α decreases when χ increases according to Eq 5.7 or Eq 5.21). Open white symbols correspond to values obtained after chitosan precipitation. C) The degree of ionization of chitosan calculated from Eq 5.21 using ^{31}P chemical shifts is in reasonable agreement with that predicted by solving Eq 5.1, Eq 5.2, Eq 5.3, Eq 5.4 and Eq 5.7 as described in the theory section. Both NMR measurements and the theory indicate a reduction in α of chitosan when heated on the order of 0.07 per 10°C.

5.5.6 Experimental influence of GP concentration c_{GP} deacetylation f_D and salt concentration c_{NaCl} on precipitation temperature T_p

The amount of GP had a significant influence on precipitation temperature (T_p) by reducing T_p as GP content increased (Figure 5.7). For example, a solution of chitosan with $f_D = 0.72$, $c_{NaCl} = 0$ mM, precipitated at 79°C when $r = c_{GP}/c_g = 1.33$ but at 25°C when $r = 10$. The decrease in T_p for increasing GP (or r) was steeper at lower values of r (Figure 5.7). The level of chitosan deacetylation also had a significant effect on precipitation temperature where chitosan with $f_D = 0.72$ precipitated at higher temperatures than chitosan with $f_D = 0.98$ (Figure 5.7). The amount of added salt exerted

yet another influence on T_p . The precipitation temperature was found to be higher in the presence of 150 mM NaCl for all solutions tested, with one exception for chitosan with $f_D = 0.98$ at $r = 1.25$ (Figure 5.7 A),. This increase in precipitation temperature with added salt was initially surprising since added salt will decrease double-layer repulsion and facilitate aggregation, which we expected at lower temperatures rather than higher. We found, however, that this salt effect on T_p could be explained by the decrease of GP pK_a with increased salt (**Tableau 5.2**), thus creating an initially higher degree of ionization of chitosan, and requiring greater heating to reduce it to the level required for precipitation, as described in more detail below.

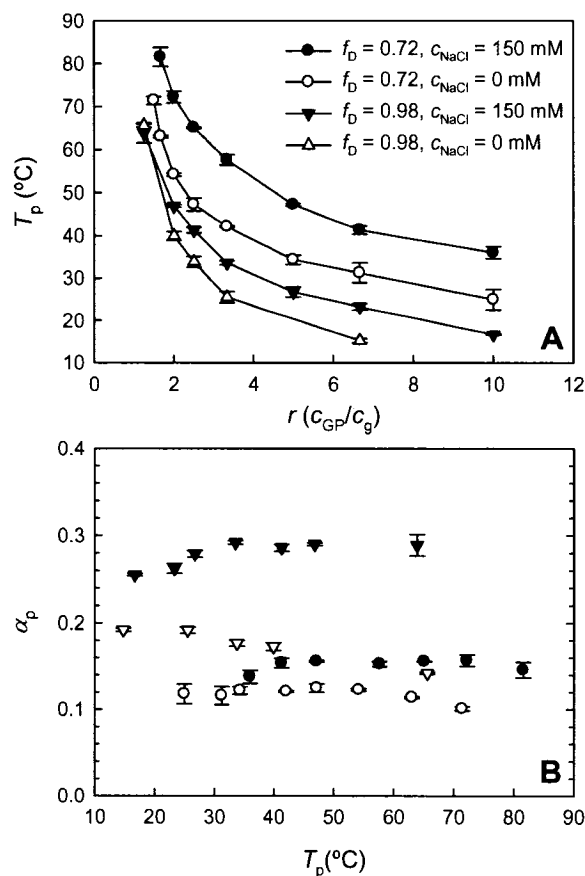


Figure 5.7. A) Temperature of precipitation of chitosan-GP mixtures from ramp tests at $1^\circ\text{C}/\text{min}$, as a function of the molar ratio of GP to glucosamine ($r = c_{GP}/c_g$) (mean $\pm$ SD, $n=3$ or $\pm$ min/max, $n=2$). The continuous lines are added for clarity and do not represent any model calculation. B) Degree of ionisation at precipitation α_p vs temperature for all solutions tested. The value of α_p was calculated from experimentally measured T_p using the PB model. The value of α_p does not change significantly with temperature. The largest variation with temperature occurs for the case $f_D = 0.98$ without added salt where α_p decreases slightly with temperature (from 0.19 at 15°C to 0.14 at 65°C), possibly due to the reduced content of mobile ions for these solutions with higher T_p .

5.5.7 PB model prediction of the influence of chitosan concentration c_{GP} deacetylation f_D and salt concentration c_{NaCl} on chitosan ionisation α versus temperature.

As described above, chitosan-GP solutions with increasing GP, added in its base form, were found to precipitate at lower temperature, a result that is consistent with increasing GP lowering chitosan ionization and raising the pH of the solution. The PB model of chitosan-GP systems further predicted that heating would reduce chitosan ionization state significantly at all molar ratios of GP to chitosan glucosamine ($r = c_{GP}/c_g$) (Figure 5.8). We hypothesized that precipitation occurred upon heating when chitosan ionization state was reduced to a critical value thereby reducing repulsive electrostatic interactions between chitosans to a level that equaled attractive interactions which then induce precipitation. We called this critical value of chitosan ionization state for precipitation α_p which was experimentally determined by using the PB model to calculate the α at the experimentally observed precipitation temperature T_p (Figure 5.7 A) to result in α_p as a function of T_p (Figure 5.7 B). The largest variation of α_p with temperature occurs for the case $f_D = 0.98$ without added salt where α_p decreases slightly with temperature (from 0.19 at 15°C to 0.14 at 65°C), possibly due to the reduced content of mobile ions for these solutions with higher T_p . However, since α_p does not change significantly with temperature, average values were calculated (**Tableau 5.3**). For example the precipitation temperatures of chitosan with $f_D = 0.72$ and with added salt at $c_{NaCl} = 150$ mM for different amounts of added GP can be visualized by shading the region of $\alpha <$

$\alpha_p=0.15$ showing the intersection of α vs T for this chitosan with the shaded zone as the precipitated region (Figure 5.8).

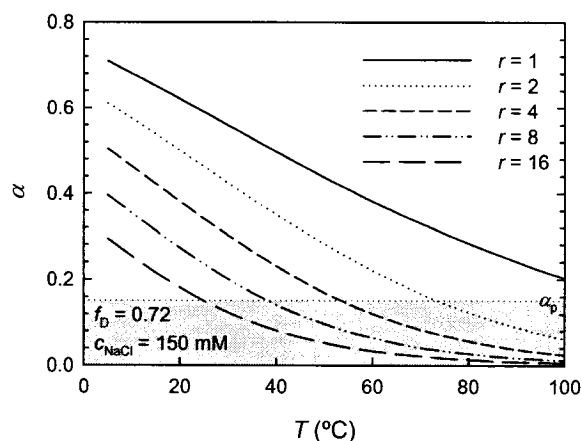


Figure 5.8. PB model predictions of chitosan ionisation α vs T for various GP/Glucosamine molar ratios ($r = c_{GP}/c_g$). The calculations were performed for chitosan at $c_g = 1.5$ mM with $f_D = 0.72$ and $c_{NaCl} = 150$ mM. The shaded grey area indicates the zone of chitosan precipitation where $\alpha \leq \alpha_p = 0.15$ corresponding to the experimentally determined α_p for $f_D = 0.72$ and $c_{NaCl} = 150$ mM (from Figure 5.7). The intersection between curves and the grey zone corresponds to the precipitation temperature T_p . Chitosan-GP solutions with lower r required higher temperatures to reach the grey zone and precipitate.

Since α_p is reasonably independent of temperature, the average values (**Tableau 5.3**) taken as constants permit a good prediction of experimental T_p vs r (Figure 5.9). We also found that α_p was higher with added salt, as expected, since electrostatic screening will

reduce repulsive chain-chain interactions and allow precipitation at higher states of chitosan ionization. Interestingly, although α_p was higher with added salt, the corresponding T_p was also higher and, as mentioned above, may appear contradictory by suggesting that greater chitosan neutralization was required to reach precipitation. However this apparent contradiction was resolved by recognizing that the GP pK_a^{GP} decreased from 6.58 with no salt to 6.21 at 150 mM NaCl (**Tableau 5.2**) which consequently raised the initial degree of ionization of chitosan in the presence of salt compared to no salt, and thereby required greater heating to reduce the state of ionization to α_p that initiates precipitation. As expected, α_p was lower for chitosan with lower f_D , consistent with the reported increased solubility of chitosans with more acetyl groups (Varum, Ottoy et al. 1994; Filion, Lavertu et al. 2007).

Tableau 5.3. Average values of α_p (from Figure 5.7 B)*

	α_p (mean $\pm$ sd, n=7)	
	$c_{NaCl} = 0 \text{ mM}$	$c_{NaCl} = 150 \text{ mM}$
$f_D=0.72$	0.12 ± 0.01	0.15 ± 0.01
$f_D=0.98$	0.18 ± 0.02	0.28 ± 0.015

*These average values were used to calculate T_p in Figure 5.9

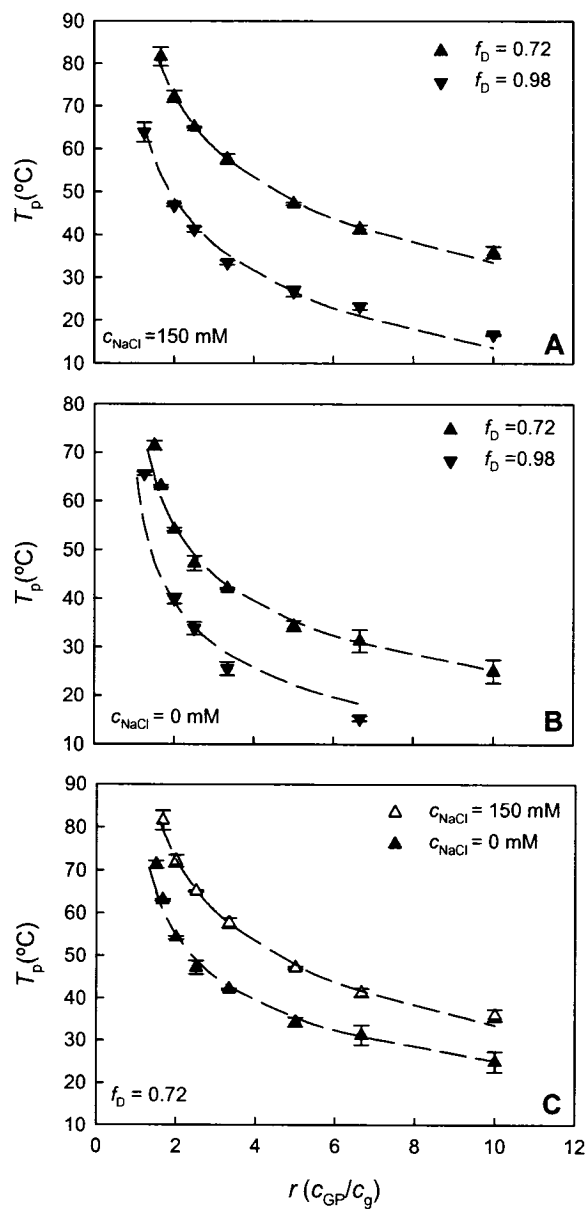


Figure 5.9. Comparison of experimental and calculated PB model values of precipitation temperature T_p from ramp tests at $1^\circ\text{C}/\text{min}$ with $c_g = 1.5$ mM, as a function of the molar ratio of GP to chitosan glucosamine ($r = c_{GP}/c_g$) (mean $\pm$ SD, $n=3$ or

$\pm \text{min/max}$, $n=2$). The PB model predictions are shown as long-dashed lines and assume constant temperature independent α_p from **Tableau 5.3** A) $c_{\text{NaCl}} = 150 \text{ mM}$. The dependence of T_p on f_D was accounted for by setting $\alpha_p = 0.15$ for $f_D = 0.72$ and $\alpha_p = 0.28$ for $f_D = 0.98$, consistent with increased acetylation increasing solubility B) $c_{\text{NaCl}} = 0 \text{ mM}$. The dependence of T_p on f_D was accounted for by setting $\alpha_p = 0.12$ for $f_D = 0.72$ and $\alpha_p = 0.18$ for $f_D = 0.98$ and are lower than the added salt case due to reduced electrostatic screening. C) Effect of the salt on T_p for $f_D = 0.72$. Here again, $\alpha_p = 0.12$ for no added salt and $\alpha_p = 0.15$ for $c_{\text{NaCl}} = 150 \text{ mM}$. Interestingly T_p was higher in the presence of salt although α_p was also higher. This salt effect was mediated by a reduced GP $\text{p}K_a^{\text{GP}}$ in the presence of added salt (**Tableau 5.3**) thus increasing the initial state of ionisation of chitosan prior to heating.

5.5.8 Critical values of chitosan ionisation at precipitation α_p depend on heterogeneous versus homogeneous processes and the strength of the basic buffer

The values obtained for α_p using temperature ramps and chitosan-GP solutions in the present study are lower than those obtained previously using potentiometric titration with NaOH (Filion, Lavertu et al. 2007) (**Tableau 5.4**). The relatively large reduction in α_p for temperature ramps and chitosan-GP versus potentiometric titration with NaOH is most likely due to the strength of NaOH as base versus GP and to the heterogeneity in the solution when titrating NaOH into a localised volume compared to homogeneous heating of chitosan/GP solutions where protons are uniformly transferred from chitosan to GP throughout the solution. Evidence for this explanation was obtained by titrating GP into chitosan and comparing precipitation kinetics to that seen when titrating NaOH

into chitosan. We found the initially observed precipitation when titrating with NaOH to be fast and abrupt as revealed by the evolution of L_T (see circle 1 in Figure 5.10A). This type of fast and abrupt decrease in L_T probably corresponds to the formation of local precipitates of chitosan at the site of injection which do not redissolve and are not in equilibrium with the rest of the solution, creating a heterogeneous mixture. Similar abrupt decreases in L_T are observed at each additional injection of NaOH following the first observed decrease, with subsequent injections resulting in the formation of additional local precipitates. At a given point however, the sharp decrease is followed by a gradual and much slower decrease of L_T (see circle 2 in Figure 5.10A). This probably occurs when the average ionization degree of chitosan throughout the solution and the precipitates is sufficiently small to permit aggregation which occurs slowly throughout the whole solution volume. It is this type of homogeneous aggregation that is expected in ramp temperature experiments of chitosan-GP solutions but only occurs during NaOH titration at α_p values that are lower than those corresponding to the initial fast precipitation events. Note that the two types of experiments (ramp vs titration) cannot be quantitatively compared since the solution titrated with NaOH is a heterogeneous mixture of precipitates and soluble chitosan once the initial precipitation events have occurred. Interestingly, however, the kinetics of neutralization when GP was titrated into chitosan were slow and continuous (Figure 5.10B), probably since 2ml of GP at pH 9 does not induce local precipitation of chitosan to the extent of 0.3ml of NaOH at pH 12. The values of α_p obtained from direct titration of GP were also similar to those obtained

from temperature ramp experiments, further confirming the above explanation for differing α_p values in this study compared to the previous one (**Tableau 5.4**).

Tableau 5.4. Comparison of Chitosan Degree of Ionisation at Precipitation from Temperature Ramps on Chitosan/GP Solutions versus Potentiometric Titration with NaOH.

	α_p^a	α_p^b
$f_D = 0.72$ $c_{NaCl} = 0 \text{ mM}$	0.12	0.25
$f_D = 0.72$ $c_{NaCl} = 150 \text{ mM}$	0.15	0.30
$f_D = 0.98$ $c_{NaCl} = 0 \text{ mM}$	0.18	0.5
$f_D = 0.98$ $c_{NaCl} = 150 \text{ mM}$	0.28	0.55

a: Temperature ramps on chitosan/GP from the present study.

b: Potentiometric Titration with NaOH from (Filion, Lavertu et al. 2007).

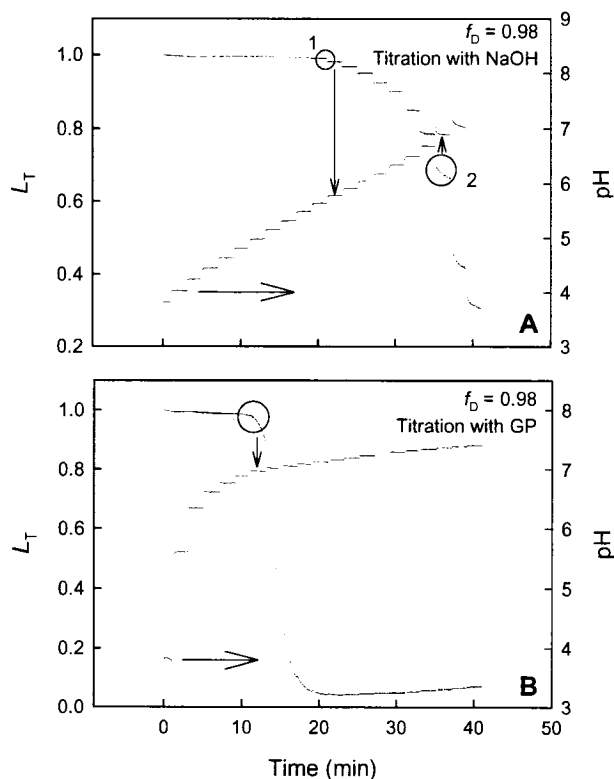


Figure 5.10. Comparison of light transmittance (L_T) in titration experiments of chitosan with NaOH (A) versus with GP (B). A: Titration with 10 mM NaOH of a chitosan solution with $c_g = 3$ mM, $c_{HCl} = 3$ mM (initial volume of 20 mL) where 0.3 mL of NaOH (pH 12) was added every 2 minutes. The intensity L_T profile reveals an initial fast creation of local chitosan precipitates at the 20 minute injection (circle 1) followed by a slower decrease in L_T at 36 minutes (circle 2). The latter probably occurs when chitosan throughout the solution has an average ionization degree that is low enough to precipitate throughout the solution rather than just locally at the point of titrant injection. B: Titration with 30 mM GP of a chitosan solution with $c_g = 3$ mM, $c_{HCl} = 3$ mM (initial volume of 20 mL) where 2 mL of GP (pH 9) was added every 2 minutes. In the case of GP addition the L_T profile does not show any evidence of local precipitation but only a

slow and continuous precipitation (circle in B) consistent with lower pH and larger injection volume of GP vs NaOH resulting in a more homogeneous process.

5.5.9 Temperature induced chitosan precipitation can be achieved using buffers other than GP, as long as they satisfy the requirements for proton transfer

We found that the temperature induced precipitation of chitosan can be observed with inorganic phosphate and MES in addition to GP (Figure 5.11). These two buffers satisfy the criteria required to accept protons from chitosan during heating since they have pK_a similar to the pK_a of chitosan (~ 6.2 and 7.2 for MES and phosphate, respectively) and their variation in pK_a with temperature satisfies Eq 5.16 $\frac{dpK_0}{dT} < \frac{dpK_{MES,Phosphate}}{dT}$ since $dpK_a/dT \sim -0.009/^\circ\text{C}$ for MES (Fukada and Takahashi 1998) and $\sim -0.002/^\circ\text{C}$ for phosphate (Fukada and Takahashi 1998) versus $-0.023/^\circ\text{C}$ for chitosan). The chitosan-buffer mixtures were prepared by mixing equal volumes of chitosan and phosphate or MES solutions, as for chitosan-GP mixtures preparation. Stock solutions of 5 mM (phosphate) and 15 mM (MES) were used so that the final concentrations in chitosan-buffer mixtures were 2.5 and 7.5 mM for phosphate and MES, respectively. Note that the MES solution was prepared with a molar ratio MES: NaOH of 1:1. Temperature ramp experiments were performed and precipitation was observed for both buffers (Figure 5.11), thus obviating the requirement for polyol groups to attain a thermogelling chitosan solution.

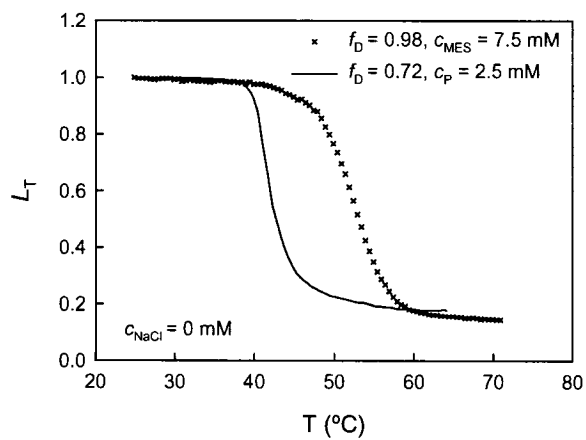


Figure 5.11. L_T profile of chitosan/phosphate and chitosan/MES mixtures as a function of temperature. A solution of MES 15 mM prepared at a molar ratio MES:NaOH of 1:1 was mixed with chitosan ($f_D = 0.98$) and a solution of phosphate disodium salt 5 mM was mixed with chitosan ($f_D = 0.72$). Both of these solutions satisfy the requirements for proton transfer and resulting chitosan precipitation upon heating.

5.6 Discussion

The primary objective of the current study was to examine the thermally induced precipitation behavior of chitosan-GP mixtures in order to investigate a proposed precipitation/gelation mechanism whereby heating induces transfer of protons from chitosan to glycerol phosphate thereby neutralizing chitosan and allowing attractive chitosan-chitosan forces to dominate and form a physical gel or precipitate. In order to theoretically predict chitosan neutralization under heating in the presence of GP we also developed a model to calculate the degree of ionization of chitosan (α = the ratio of protonated glucosamine monomer to total glucosamine monomer) and its dependence on temperature in the presence of GP. The model used solution electroneutrality, acid-base equilibria of chitosan and GP including their temperature dependent pK_a s and a Poisson-Boltzmann cylindrical cell model to calculate the electrostatic component of chitosan pK_a . We found that the model was able to accurately predict the pH of chitosan-GP mixtures (Figure 5.4). The model also predicted a significant proton transfer from chitosan to GP upon heating (Figure 5.8). This transfer of protons is due to the large difference between dpK_a/dT of chitosan (-0.023 pK units/ $^{\circ}$ C) versus dpK_a/dT of GP ($\sim$ 0.000 pK units/ $^{\circ}$ C). This theoretically predicted proton transfer was confirmed by monitoring the ^{31}P chemical shift of GP as a function of temperature in chitosan-GP mixtures where the model predicted reasonably well the NMR monitored degree of association of GP and thereby the degree of ionization of chitosan (Figure 5.6). Furthermore, we found that for a given f_D and ionic strength, the value of the degree of

ionisation of chitosan at precipitation, α_p , did not change with temperature (Figure 5.7 B and **Tableau 5.3**), suggesting no significant increase of hydrophobicity or strengthening of hydrophobic interactions with temperature, contrary to previously proposed mechanisms of gelation in chitosan-GP systems (Chenite, Chaput et al. 2000; Chenite, Buschmann et al. 2001; Cho, Heuzey et al. 2005; Cho, Heuzey et al. 2006).

We found that by specifying α_p for a given f_D and ionic strength, that the model accurately predicted the temperature of precipitation of chitosan-GP mixtures with various compositions (Figure 5.9). Increasing salt ($C_{NaCl} = 150$ mM) increased the value of α_p (Figure 5.7 B) but did not decrease the value of T_p (Figure 5.7 A), the latter due to the decrease of GP pK_a with increased salt (**Tableau 5.2**), thus creating an initially higher degree of ionization of chitosan and requiring greater heating to reduce it to the level required for precipitation. α_p also increased with f_D (Figure 5.7 B and **Tableau 5.3**) due to the lower solubility of chitosans with high f_D as it appears that increasing the fraction of monomers bearing acetyl groups is effective at blocking inter-chain associations, possibly due to steric hindrance via these side groups and/or to a more difficult alignment of the polymer chains with increasing amount of acetyl groups, as suggested previously (Varum, Ottoy et al. 1994; Fillion, Lavertu et al. 2007). For this same reason, T_p was found to decrease with f_D (Figure 5.7 A). The values obtained for α_p using temperature ramps and chitosan-GP solutions in the present study were found to be lower than those obtained previously using potentiometric titration with NaOH (Fillion, Lavertu et al. 2007) (**Tableau 5.4**). The relatively large reduction in α_p for

temperature ramps and chitosan-GP versus potentiometric titration with NaOH is most likely due to the heterogeneity in the solution when titrating NaOH into a localised volume compared to homogeneous heating of chitosan/GP solutions. Evidence for this explanation was obtained by titrating GP into chitosan and comparing precipitation kinetics to that seen when titrating NaOH into chitosan (Figure 5.10).

We also identified alternatives to GP that produce thermogelling chitosan systems. In particular chitosan in the presence of inorganic phosphate or MES were thermosensitive, suggesting that the glycerol moiety of GP is nonessential. Rather, the key essential feature of the buffer added to chitosan is its ability to absorb heat stimulated release of chitosan protons. A theoretical expression (Eq 5.16) for determining the variation of the ionization degree of chitosan with temperature in these systems was derived and it was shown that the sufficient condition for heating to induce neutralization of the polyion is

$$\frac{dpK_0}{dT} < \frac{dpK_a}{dT} \text{ where } pK_0 \text{ is the intrinsic dissociation constant of chitosan and } pK_a \text{ is the}$$

dissociation constant of the buffer coupled to chitosan. This relation is particularly useful to identify potential buffers in order to obtain thermosensitive chitosan gels or for other polyelectrolytes (cationic or anionic) that precipitate upon neutralization. Taken together, our results suggest that the aggregation/gelation in the chitosan-GP system induced by heating is the result of a progressive and homogeneous reduction of the degree of ionization of chitosan. This reduction of the surface charge density of the polyelectrolyte results in reduced forces of repulsion between double-layers and permits

attractive inter-chain forces to dominate. To our knowledge, this is the first report identifying a thermogelation mechanism as the neutralization of a polyelectrolyte.

The DLVO theory (Deryagin and Landau 1941; Verwey and Overbeek 1948) of colloidal stability can be used to interpret our findings based on a balance between the double-layer repulsion and attractive forces such as van der Waals interactions. If the surface of a colloidal particle is sufficiently charged, there is a significant energy potential barrier limiting aggregation and the solution is termed kinetically stable. However, when the charge density of the particle is reduced, this potential barrier to aggregation, that is analogous to an activation energy for a chemical reaction, is also reduced and when reduced to zero, rapid coagulation is observed. For chitosan in solution, the electrostatic double-layer repulsion appears to control solution stability and precipitation where the balancing attractive components could include van der Waals, hydrogen bonding and hydrophobic interactions since these interactions have been reported for chitosan (Amiji 1995; Nystrom, Kjoniksen et al. 1999; Philippova, Volkov et al. 2001). In the presence of a proton acceptor such as GP, heat will drive the system from a kinetically stable to an unstable solution when attractive forces overcome the reduced electrostatic repulsion force. We can therefore interpret the α_p values found for chitosan as corresponding to the charge density at which the chitosan presents a relatively rapid aggregation. In sufficiently concentrated solutions, this homogeneous neutralization leads to the formation of a gel (Chenite, Chaput et al. 2000; Chenite, Buschmann et al. 2001; Cho, Heuzey et al. 2005).

We have identified electrostatic repulsion (via α) as the force that varies most significantly with temperature in chitosan-GP systems and is therefore responsible for temperature induced precipitation/gelation of chitosan-GP systems. NMR data and theory show that upon heating from 5 to 55°C, α changes from 0.55 to 0.17, for a chitosan solution with $c_g = 1.5$ mM, $f_D = 0.72$, $c_{GP} = 5$ mM and $c_{NaCl} = 150$ mM, considerably decreasing the double-layer repulsion energy. For example, this electrostatic energy is proportional to α^2 for the simplified case of two charged surfaces approaching each other at constant low surface potentials where the PB equation can be linearized (Evans 1998), i.e. for high c_{NaCl} and/or low α . The electrostatic energy also increases approximately linearly with temperature due to the particular variation of the water permittivity with temperature. Thus, the interchain electrostatic repulsion energy is approximately proportional to $T\alpha^2$ such that changing α from 0.55 to 0.17 corresponds to a very significant reduction of the energy of electrostatic repulsion to about 1/10 of its initial value, again identifying interchain electrostatic forces as dominating solubility vs precipitation of chitosan and its associated sensitivity to temperature.

Cho et al.(Cho, Heuzey et al. 2005) reported an increased ionic strength upon heating solutions of chitosan-GP and stated that both this enhanced screening of electrostatic repulsion and increased hydrophobic interactions resulted in favorable conditions for gel formation. However our study does not support this hypothesis since we found the proportion of GP^{2-} to decrease with temperature (Figure 5.6 and Figure 5.8, i.e. when α decreases, GP^{2-} decreases) and so the ionic strength of chitosan-GP solutions actually

decreases slightly with increased temperature. The error made in this previous study (Cho, Heuzey et al. 2005) originates from an approximation used to calculate the temperature dependence of the pK_a in the system where it was assumed that the pK_a of GP would decrease significantly with temperature while it actually increases slightly (Figure 5.2).

The analysis presented here relies on the evaluation of α (and α_p) that are theoretically calculated. The ability of the model to accurately predict α is limited by the uncertainty of chitosan pK_0 obtained from extrapolating titration curves as identified previously (Filion, Lavertu et al. 2007). Although an imprecision in pK_0 would shift the calculated values of α_p , this would not alter the general conclusion that α_p is temperature independent since the derivative dpK_a/dT is unaffected by a constant offset due to any error in pK_0 . In spite of the influence of a possible imprecision in chitosan pK_0 , we found measured and theoretically predicted pH of chitosan-GP mixtures to agree well and additionally found good agreement between the model and NMR results for the temperature dependence of chitosan ionization degree. Notably, the presence of added salt facilitates interpretation since mobile ion content in these solutions does not change significantly with temperature and since the pK_{ap} of chitosan with added salt is known with greater accuracy (smaller electrostatic contribution) compared to salt-free solutions. Additionally a low $\alpha_p < 0.3$ also facilitates agreement between the model and

experiments by avoiding any error in pK_{ap} at high α values in the absence of salt where

the electrostatic contribution $\frac{-e\psi|_{r=a}}{kT \ln 10}$ to pK_{ap} is dominant.

This study has highlighted the important role of proton transfer in polyelectrolyte systems exposed to temperature changes and the need to carefully evaluate its effects on solution properties including solubility, precipitation and gelation. This understanding of the thermogelling mechanism in chitosan-GP solutions can be used to specifically design thermosensitive systems composed of a titratable polyelectrolyte and buffer with temperature dependent pK_a . As an example, a hydrophobic polyanion with a small pK_a variation with temperature could be coupled to glucosamine. A specific advancement resulting from our study for chitosan systems is that we provide a systematic approach to prepare chitosan solutions with predictable gelation properties covering a wide range of gelation temperatures, salt conditions and chitosan f_D .

5.7 Appendix I : Derivation of the Dependence of Chitosan Ionisation State α on Temperature

The degree of ionization of polyelectrolytes in solution varies with temperature in a manner predicted by the temperature-dependence of their dissociation constants. The following demonstration applies to an aqueous solution containing chitosan and the disodium salt of GP, however, it can be generalized to any system composed of two weak electrolytes where each has a single dissociation equilibrium (as for GP in the range of pH of this study where the other dissociation equilibrium can be neglected). The theoretical expression of the apparent pK_a of a polyelectrolyte is given in the mean field approximation is given by (Marcus 1955; Ullner 2002):

$$pK_{ap}(T) = pH(T) - \log_{10} \frac{1-\alpha}{\alpha} = pK_0(T) - \frac{e\psi|_{r=a}}{\ln 10 kT}$$

Eq 5.1

Previous titration experiments on chitosan combined with a mean field molecular unit cell model have shown (Filion, Lavertu et al. 2007) that the right most term in Eq 5.1 is approximately linear with α (especially with added salt and/or at low ionization degree of the macroion) such that the pK_{ap} of chitosan can be expressed as

$$pK_{ap}(T) \approx pK_0(T) - m(T)\alpha \quad \text{where} \quad m(T)\alpha \approx \frac{e\psi|_{r=a}}{\ln 10 kT}$$

Eq 5.22

This previous study also demonstrated that $m(T)$ does not vary significantly with temperature (Filion, Lavertu et al. 2007). Eq 5.9 can then be rewritten by taking m as depending only on ionic strength, and not on temperature:

$$\text{p}K_{\text{ap}}(T) \approx \text{p}K_0(T) - m\alpha$$

Eq 5.23

For chitosan that is a cationic polyelectrolyte, m is positive since $\psi|_{r=a} > 0$, and $\text{p}K_{\text{ap}}$ decreases as the charge state α increases. The dissociation equations for chitosan and GP are written as (note that the dependence on temperature of dissociation constants in the following equations is implicit since $K(T)$ is written as K):

$$K_{\text{ap}} = \frac{c_{\text{H}^+}(1-\alpha)}{\alpha} \Rightarrow \ln(10^{-\text{p}K_{\text{ap}}}) \simeq \ln(10^{m\alpha} K_0) = \ln(1-\alpha) - \ln \alpha + \ln c_{\text{H}^+}$$

Eq 5.24

$$K_{\text{GP}} = \frac{c_{\text{H}^+}(1-\chi)}{\chi} \Rightarrow \ln K_{\text{GP}} = \ln(1-\chi) - \ln \chi + \ln c_{\text{H}^+}$$

Eq 5.25

The macroscopic electroneutrality condition for the system is given by Eq 5.6 (H^+ and OH^- are neglected):

$$\bar{c}_{\text{Cl}} + \bar{c}_{\text{GP}^-} + 2\bar{c}_{\text{GP}^{2-}} - \bar{c}_{\text{Na}} - c_{\text{g}}^+ = 0$$

Eq 5.6

Knowing that $\bar{c}_{\text{Cl}}$ and $\bar{c}_{\text{Na}}$ do not change with temperature and that $d\bar{c}_{\text{GP}^{2-}} = -d\bar{c}_{\text{GP}^{+}}$, differentiating of Eq 5.24, Eq 5.25 and Eq 5.6 provides

$$-d \ln K_0 = \frac{d\alpha}{1-\alpha} + \frac{d\alpha}{\alpha} + m \ln 10 d\alpha - \frac{dc_{\text{H}^+}}{c_{\text{H}^+}}$$

Eq 5.26

$$-d \ln K_{\text{GP}} = \frac{d\chi}{1-\chi} + \frac{d\chi}{\chi} - \frac{dc_{\text{H}^+}}{c_{\text{H}^+}}$$

Eq 5.27

$$d\bar{c}_{\text{GP}^{+}} = -dc_{\text{g}}^{+} \Rightarrow d\chi = -\frac{c_{\text{g}}}{\bar{c}_{\text{GP}}} d\alpha = -\frac{1}{r} d\alpha$$

Eq 5.28

where r is again the ratio of total GP to total glucosamine ($\bar{c}_{\text{GP}}/c_{\text{g}}$). Eq 5.28 simply represents the fact that an increase of the acidic form of chitosan must be balanced with an equivalent decrease of the acidic form of GP. By subtracting Eq 5.27 from Eq 5.26, we obtain:

$$-d \ln K_0 + d \ln K_{\text{GP}} = \frac{d\alpha}{1-\alpha} + \frac{d\alpha}{\alpha} + m \ln 10 d\alpha - \frac{d\chi}{1-\chi} - \frac{d\chi}{\chi}$$

Eq 5.29

Using Eq 5.28 in Eq 5.29, we have:

$$-d \ln K_0 - d \ln K_{\text{GP}} = \left(\frac{1}{1-\alpha} + \frac{1}{\alpha} + m \ln 10 + \frac{1}{r(1-\chi)} + \frac{1}{r\chi} \right) d\alpha$$

Eq 5.30

such that

$$\frac{d\alpha}{dT} = \frac{\ln 10 \left(\frac{dpK_0}{dT} - \frac{dpK_{GP}}{dT} \right)}{\left(\frac{1}{\alpha(1-\alpha)} + \frac{1}{r} \times \frac{1}{\chi(1-\chi)} + m \ln 10 \right)}$$

Eq 5.16

Note that if we used Eq 5.1 directly rather than the approximation of Eq 5.23 m would

simply be replaced by $\frac{e}{\ln 10 kT} \frac{d\psi|_{r=a}}{d\alpha}$. Thus, since α and χ range from 0 to 1 and m and

r are positive, $\frac{d\alpha}{dT} < 0$ if $\frac{dpK_0}{dT} < \frac{dpK_{GP}}{dT}$. Note that m is positive for a cationic

polyelectrolyte and that for simple acid/base electrolytes, the variation of α with temperature is obtained from Eq 5.16 by taking $m = 0$.

Eq 5.16 predicts a significant change in the charge state when $\left| \frac{dpK_0}{dT} - \frac{dpK_{GP}}{dT} \right|$ and

$r = \frac{c_{GP}}{c_g}$ have high values and when m is small (i.e. for amounts of added salt sufficient

to reduce electrostatic contribution to chitosan pK_{ap}). Another condition that is required to induce significant change in charge state upon heating is that α and χ are not too close to 0 or 1, meaning that the pK_a of the two buffers must be similar.

We can rearrange Eq 5.16 by expressing χ as a function of the K_a and α in order to show more clearly that the pK_a 's must be of the same order. First, we obtain an expression for c_{H^+} and χ from Eq 5.24 and Eq 5.25:

$$\chi = \frac{c_{\text{H}^+}}{K_{\text{GP}} + c_{\text{H}^+}}, \quad 1 - \chi = \frac{K_{\text{GP}}}{K_{\text{GP}} + c_{\text{H}^+}}$$

Eq 5.31

and

$$c_{\text{H}^+} = K_{\text{ap}} \frac{\alpha}{(1 - \alpha)}$$

Eq 5.32

Inserting Eq 5.32 into Eq 5.31, we obtain

$$\chi(1 - \chi) = \frac{c_{\text{H}^+} K_{\text{GP}}}{(K_{\text{GP}} + c_{\text{H}^+})^2} = \frac{\frac{\alpha}{(1 - \alpha)} K_{\text{ap}} K_{\text{GP}}}{\left(K_{\text{GP}} + \frac{\alpha}{(1 - \alpha)} K_{\text{ap}}\right)^2} = \alpha(1 - \alpha) \frac{K_{\text{ap}} K_{\text{GP}}}{((1 - \alpha) K_{\text{GP}} + \alpha K_{\text{ap}})^2}$$

Eq 5.33

Finally, by substituting this last equation in Eq 5.16, we find:

$$\frac{d\alpha}{dT} = \frac{\ln 10 \left(\frac{dpK_0}{dT} - \frac{dpK_{\text{GP}}}{dT} \right)}{\left(\frac{1}{\alpha(1 - \alpha)} \left(1 + \frac{1}{r} \frac{((1 - \alpha) K_{\text{GP}} + \alpha K_{\text{ap}})^2}{K_{\text{ap}} K_{\text{GP}}} \right) + m \ln 10 \right)}$$

Eq 5.34

which shows clearly that if the K_{a} 's differ significantly (i.e. $\frac{K_{\text{GP}}}{K_{\text{ap}}} \ll 1$ or $\frac{K_{\text{GP}}}{K_{\text{ap}}} \gg 1$),

then $\frac{d\alpha}{dT}$ will be small.

5.8 Acknowledgements

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. ML received a doctoral fellowship from the Canadian Institutes of Health Research. DF received a doctoral fellowship from le Fonds de recherche sur la nature et les technologies Québec. The authors would also like to thank Dr Anne Danion for NMR measurements.

CHAPITRE 6: ARTICLE - HIGH EFFICIENCY GENE TRANSFER USING CHITOSAN/DNA NANOPARTICLES WITH SPECIFIC COMBINATIONS OF MOLECULAR WEIGHT AND DEGREE OF DEACETYLATION

6.1 Abstract

Chitosan is a biodegradable natural polysaccharide that has shown potential for gene delivery, although the ideal molecular weight (MW) and degree of deacetylation (DDA) for this application have not been elucidated. To examine the influence of these parameters on gene transfer, we produced chitosans with different DDAs (98, 92, 80 and 72%) and depolymerized them with nitrous acid to obtain different MWs (150, 80, 40, 10 kDa). We produced 64 formulations of chitosan/pDNA complexes (16 chitosans, 2 amine-to-phosphate (N:P) ratios of 5:1 and 10:1 and 2 transfection media pH of 6.5 and 7.1), characterized them for size and surface charge, and tested them for gene transfection in HEK 293 cells *in vitro*. Several formulations produced high levels of transgene expression while two conditions, 92-10-5 and 80-10-10 [DDA-MW-N:P ratio] at pH 6.5, showed equivalence to our best positive control. The results also revealed an important coupling between DDA and MW of chitosan in determining transgene expression. Maximum expression was obtained with a certain combination of DDA and MW that depended on N:P ratio and the pH, but similar expression levels could be achieved by simultaneously lowering MW and increasing DDA or lowering DDA and increasing MW, suggesting a predominant role of particle stability, through co-operative electrostatic binding, in determining transfection efficiency.

Keywords: gene delivery, chitosan, transfection, plasmid DNA, nanotechnology.

Running Title: High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles

6.2 Introduction

Chitosan molecular weight (MW) as well as the amount of amine groups (degree of deacetylation or DDA) on the chain have a major influence on its biological and physicochemical properties (Tomihata and Ikada 1997; Zhang and Neau 2001; Huang, Khor et al. 2004). For example, the amount and distribution of acetyl groups affects biodegradability since the absence of acetyl groups or their homogeneous distribution (random rather than block) results in very low rates of enzymatic degradation (Aiba 1992).

As a non-viral vector for gene delivery, chitosan offers certain advantages compared to viral vectors which can produce endogenous recombination, oncogenic effects and immunological reactions leading to potentially serious complications (Somia and Verma 2000; Ferber 2001). In addition to chitosan being biocompatible and biodegradable, chitosan/pDNA complexes can be easily prepared at low cost, and can be used without restricting plasmid size to provide effective protection against DNases (Cui and Mumper 2001; Aral and Akbuga 2003; Bozkir and Saka 2004), in addition to amenability to lyophilization (Leong, Mao et al. 1998). The main drawback currently with non-viral systems is their typically low transfection efficiency.

To improve transfection efficiency, recent studies have examined the use of low molecular weight chitosans (Erbacher, Zou et al. 1998; Lee, Kwon et al. 1998; MacLaughlin, Mumper et al. 1998; Richardson, Kolbe et al. 1999; Ishii, Okahata et al.

2001; Koping-Hoggard, Tubulekas et al. 2001; Lee, Nah et al. 2001; Sato, Ishii et al. 2001; Li, Lee et al. 2003; Park, Kim et al. 2003; Romoren, Pedersen et al. 2003) and oligomers (Thanou, Florea et al. 2002; Koping-Hoggard, Mel'nikova et al. 2003; Koping-Hoggard, Varum et al. 2004) in gene delivery vectors. It appears that a fine balance must be achieved between extracellular DNA protection (better with high MW) versus efficient intracellular unpackaging (better with low MW) in order to obtain high levels of transfection (Koping-Hoggard, Varum et al. 2004). Since commercially available bulk chitosans are typically high molecular weight, methods to depolymerize chitosan have been developed using ultrasound (Tang, Huang et al. 2003; Cravotto, Tagliapietra et al. 2005), heat (Jarry, Chaput et al. 2001; No, Nah et al. 2003), enzymatic hydrolysis (Howard, Ekborg et al. 2003) and chemical hydrolysis (Hirano, Kondo et al. 1985; Allan and Peyron 1995; Allan and Peyron 1995; Tommeraas, Varum et al. 2001; Kato, Onishi et al. 2002; Mao, Shuai et al. 2004). Depolymerization of chitosan using nitrous acid is becoming a favored technique since it is economical, rapid and can be controlled to produce chitosan of a preselected size (Allan and Peyron 1995). Although there are a number of reports relating the effect of chitosan MW on transfection efficiency at certain DDAs, none to date have performed a systematic study of the combined effect of MWs in the low to intermediate range (10-150 kDa) and DDAs in the range 70-100%, the two most important physicochemical parameters of chitosan that govern the characteristics and transfection efficiency of these polyelectrolyte complexes.

Here, we investigate the influence of both MW, in the low to intermediate range, and DDA of chitosan on transfection efficiency, simultaneously. We hypothesized that 1) an optimum MW for transfection efficiency would occur in this 10-150kDa range, reflecting a balance between packaging stability and intracellular disassembly of complexes and that 2) lower DDAs would allow greater transfection due to greater degradability and release of pDNA. In preliminary experiments, parameters defining the preparation of nanoparticles (mixing method, incubation time) and *in vitro* transfection (pH of the transfection media, amine to phosphate ratio (N/P), amount of pDNA) were optimized. Chitosan/pDNA complexes were then prepared using chitosans with four different DDAs (98, 92, 80 and 72%), each depolymerized to four different MWs in the low range (150, 80, 40, 10 kDa) and were characterized for size and surface charge. Transfection efficiency of these nanoparticles was then assessed on HEK 293 cells *in vitro*, using a plasmid containing a fusion of an enhanced green fluorescent protein (EGFP) and a luciferase reporter gene, the former detected with flow cytometry and the latter with luminometry. Obtained transfection efficiencies were compared with phospholipid-based commercial systems (Lipofectamine[™], FuGENE 6).

6.3 Materials and Methods

6.3.1 Materials

Deuterium oxide (Cat #15,188-2), deuterium chloride 20% (w/v) in deuterium oxide (Cat #17,672-9), sodium nitrite (Cat #431605), hydrochloric acid (Cat #31,894-9) and glacial acetic acid (Cat #33,882-6) were from Aldrich. Sodium azide (Cat #S2002), N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES, Cat #H-4034), 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (MES, Cat #M-2933) and 1N sterile filtered hydrochloric acid (HCl, Cat #H9892) were from Sigma. Anhydrous sodium acetate, Omnipur (Cat #EM7510) was from VWR. Sodium hydroxide (Cat #S320-1) was from Fisher. HEK 293 cells were from ATCC (ATCC #CRL 1573). Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose (DMEM HG, Cat #12100-046), Fetal Bovine Serum (FBS, Cat #26140-079), Lipofectamine™ (Cat #18324-111), Trypsin-EDTA (Cat #25200-056) and Competent DH5α cells (Cat #182630-12) were from LifeTechnologies. FuGENE 6 Transfection Reagent (Cat #1815091) was from Roche Diagnostics. Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Cat #E2620) and Glo Lysis Buffer (Cat #E2661) were from Promega. BCA™ Protein Assay Kit (Cat #23227) and Compat-Able™ Preparation Reagent Set (Cat #23215) were from Pierce Biotechnology. The plasmid EGFPLuc was from Clontech Laboratories (Cat #6169-1). The EndoFree Plasmid Mega Kit (Cat #12381) was from Qiagen.

6.3.2 Bulk Chitosans

Ultrapure chitosan samples (Ultrasan[™]) were provided by BioSyntech Inc. (Laval Qc., Canada) where quality controlled manufacturing processes eliminate contaminants including proteins, bacterial endotoxins, toxic metals, inorganics and other impurities. All chitosans had less than 500 EU/g of bacterial endotoxins. Chitosans were selected to have a range of degree of deacetylation from 98-72% and these bulk batches were named accordingly (**Tableau 6.1**). These chitosans were produced by heterogeneous deacetylation resulting in a block rather than random distribution of acetyl groups.

6.3.3 Preparation of Depolymerized Chitosans

Chitosans of different DDA were depolymerized using nitrous acid to achieve specific number-average molecular weight targets (M_n) of 150, 80, 40 and 10 kDa, except for BST-98 which already had a starting M_n of 120 kDa, that therefore replaced the 150 kDa chitosan for 98% DDA. For depolymerization, chitosans were dissolved overnight at 0.5% (w/v) in 50 mM hydrochloric acid under magnetic stirring and then treated for 16 hours at room temperature with specific amounts of sodium nitrite in the range of 0.001-0.1 mole per mole of chitosan glucosamine. The reaction was stopped by precipitation using 6N sodium hydroxide to bring the pH above 10. Chitosans were then washed by repeated centrifugation (4000g for 2 min) and resuspended in deionized

water, until the supernatant reached neutral pH. The samples were freeze-dried prior to characterization and use in the production of nanoparticles.

6.3.4 *Characterization of Depolymerized Chitosans*

Number- and weight-average molecular weights (M_n and M_w) of chitosans were determined by gel permeation chromatography (GPC) using a Hewlett Packard Series 1100 chromatographic system equipped with a refractive index detector (Agilent technologies Inc., Mississauga ON, Canada) combined with a Viscotek T60A dual detector (Viscotek, Houston TX, USA) containing light scattering and viscometer detectors. Dry chitosan powder was dissolved in duplicate for 24 hours on a rotary mixer (Labquake[®], Barnstead International Inc., Dubuque IA, USA) at 1 mg/ml in the mobile phase consisting of acetic acid 0.3 M, sodium acetate 0.2 M and sodium azide 0.8 mM, pH=4.5. The solutions were filtered prior to injection using a 0.45 μ m nylon membrane syringe filter (Life Science, Petersborough ON, Canada). The samples were then run on an analytical SEC polymer-based linear (mixed-bed) column (TSK-Gel GMPWXL, Viscotek) at a flow-rate of 0.8 mL/min and a column temperature of 25°C. The system was calibrated with a narrow standard, PolyCAL[™] Polyethylene Oxide-PEO26K (Viscotek) and subsequently validated with a broad standard PEOX500K (M_n 180.6 kDa, M_w 475.5 kDa; American Polymer Standards, Mentor OH, USA). Integration boundaries were set using TriSEC GPC software (Viscotek) by manual inspection of the elution profile and were always set by the same analyst.

Degree of deacetylation was determined by ^1H NMR according to Lavertu *et al.* (Lavertu, Xia et al. 2003). Briefly, chitosan solutions were prepared by stirring, at room temperature, 10 mg of chitosan in 1.96 ml of D_2O containing 0.04 ml of DCl for 30 minutes to ensure complete dissolution of the polymer. After dissolution, approximately 1 ml of the chitosan solution was transferred to a 5 mm NMR tube. The sample tube was inserted in the magnet and allowed to reach thermal equilibrium at 70°C (10 minutes) before performing the experiment. ^1H NMR spectra were acquired on a Varian Mercury 400 MHz spectrometer as described previously (Lavertu, Xia et al. 2003). As measured by Lavertu *et al.*, this technique gives an excellent precision on DDA measurements with a coefficient of variation less than 0.8%.

6.3.5 Plasmid DNA

The plasmid EGFPLuc of 6.4 kb (Clontech Laboratories) encodes for a fusion of enhanced green fluorescent protein (EGFP) and luciferase from the firefly *Photinus pyralis*, driven by a Human cytomegalovirus (CMV) promoter. This plasmid was amplified in DH5 α bacteria and purified using the EndoFree Plasmid Mega Kit (Qiagen). The purified pDNA was dissolved in endotoxin-free tris-EDTA (TE) and concentration/purity determined by UV spectrophotometry by measuring absorbance at 260/280 nm.

6.3.6 *Preparation of Chitosan/pDNA Nanoparticles*

Depolymerized chitosans were dissolved overnight on a rotary mixer at 0.5% (w/v) in hydrochloric acid using a glucosamine:HCl ratio of 1:1. Chitosan solutions were then diluted with deionized water to reach the desired amine (deacetylated groups) to phosphate ratio when 100 μ L of chitosan would be mixed with 100 μ L of pDNA, the latter always at a concentration of 330 μ g/mL in endotoxin-free tris-EDTA (TE). Prior to mixing with pDNA, the diluted chitosan solutions were sterile filtered with a 0.2 μ m syringe filter and ninhydrin assays indicated that chitosan was not trapped in the filter (Prochazkova, Varum et al. 1999). Chitosan/pDNA nanoparticles were then prepared by adding 100 μ L of the sterile diluted chitosan solution to 100 μ L of pDNA (330 μ g/mL) at room temperature, pipetting up and down and tapping the tubes gently. Chitosan/pDNA nanoparticles were then used for transfection 30 minutes after preparation.

6.3.7 *In vitro Transfection*

HEK 293 cells were cultured in DMEM HG with 1.85 g/L of sodium bicarbonate and supplemented with 10% FBS at 37°C and at 5% CO₂. Cells were subcultured according to ATCC recommendations without any antibiotics. The absence of mycoplasma was verified by fluorescence detection according to Hay (Hay 1992). For transfection, HEK 293 cells were plated in 24-well culture plates using 500 μ L/well of complete medium

and 50,000 cells/well, incubated at 37°C, 5% CO₂. The cells were transfected the next day at ~50% confluency.

6.3.8 *Transfection with Chitosan/pDNA Nanoparticle Complexes*

Complete transfection media were equilibrated overnight at 37°C and 5% CO₂ and pH adjustment was performed with 1N sterile HCl just before transfection. In order to increase pH stability of transfection media, HEPES (for pH 7.1 and 7.4) and MES (for pH 6.5) were added to DMEM HG and sodium bicarbonate concentration was decreased accordingly. Chitosan/pDNA complexes were prepared, as described above, 30 minutes before being incubated with cells. Medium over cells was then aspirated and replenished with 500 µl transfection medium containing chitosan/pDNA complexes at a concentration of 2.5 µg pDNA/well, unless otherwise noted. Cells were incubated with chitosan/pDNA complexes until analysis at 48 hours post-transfection. Cells were then observed under a fluorescence microscope (Zeiss Axiovert) to monitor any morphological changes and to obtain an estimate of the transfection efficiency. Transfection efficiencies and transgene expression levels were quantitatively assessed by flow cytometry and luciferase assay, respectively. FuGENE 6 and Lipofectamine[™] were used as positive controls and uncomplexed naked pDNA was used as a negative control. All experiments were done in duplicates, with a minimum of three separate experiments to demonstrate reproducibility.

6.3.9 Transfection with FuGENE 6

FuGENE 6/pDNA complexes were prepared with a 1:3 ratio of pDNA(μ g):FuGENE 6(μ l), according to manufacturer specifications and were used as a positive control. The transfection medium was identical to that of chitosan. Cells were incubated for 48 hours with FuGENE 6/pDNA complexes (2.5 μ g pDNA/well) until analysis.

6.3.10 Transfection with Lipofectamine[™]

Lipofectamine[™]/pDNA complexes were prepared with a 1:2 ratio of pDNA(μ g):Lipofectamine[™](μ l) according to manufacturer specifications and were used as a positive control. Due to toxicity observed with longer incubations, cells were only incubated for four hours with Lipofectamine[™]/pDNA complexes (2.5 μ g pDNA/well), in serum free medium and then replenished with complete media.

6.3.11 EGFP/Flow Cytometric Determination of Transfection Efficiency

Cells exposed to transfection agents were trypsinized (trypsin 0.25%-EDTA) and once detached, complete medium was added to inhibit trypsin. Cell suspensions were then transferred to 5 mL flow cytometry tubes and GFP expression in the transfected cells determined using a MoFlo cytometer (MoFlo BTS, DakoCytomation, Carpinteria CA, USA) equipped with a 488 nm argon laser for excitation (model ENTCII-621, Coherent, Santa Clara CA, USA). For each sample, 5,000-10,000 events were collected and fluorescence was detected through 510/20 nm (FL1) and 580/30 nm (FL2) band pass

filters with photomultiplier tube voltages of 475 and 500, respectively. In addition, forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) was used to establish a collection gate to exclude dead cells and debris. Signals were amplified in logarithmic mode for fluorescence and Summit software (v. 3.1, DakoCytomation) was used to determine the GFP positive events by a standard gating technique. The control sample (cells only) was displayed on a dot plot (FL1 vs. FL2) and the gate drawn such that control cells were excluded. The percentage of positive events was calculated as the events within the gate divided by the total number of events, excluding dead cells and debris.

6.3.12 Luciferase Determination of Transfection Efficiency

In the culture wells used to assess luciferase activity, culture medium was replaced with 100 μ L of Glo Lysis Buffer (Promega, Madison WI, USA) until complete lysis. Aliquots of 50 μ L were transferred to 96-well white luminometer plates where an equal amount of Bright-Glo[™] substrate (Promega) was added just prior to measurement on a Fusion luminometer (PerkinElmer, Wellesley MA, USA). An aliquot of 25 μ L was treated with Compat-Able[™] Preparation Reagent Set (Pierce Biotechnology, Rockford IL, USA) to remove interfering substances from the Glo Lysis Buffer prior to determining the protein content using BCA[™] Protein Assay kit (Pierce Biotechnology). The relative light units (RLU) were normalized to the protein content of each sample.

6.3.13 Nanoparticle Size and Surface Charge Analysis

Size of chitosan/pDNA complexes was determined by dynamic light scattering at an angle of 173° at 25°C, using a Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, UK). Samples were measured in triplicates using the refractive index and viscosity of pure water in calculations. The zeta potential (surface charge) was measured in duplicates with laser Doppler velocimetry at 25°C on the same instrument, and with the viscosity and dielectric constant of pure water for calculations. For both of the above measurements, nanoparticles were diluted 1:25 in PBS containing calcium and magnesium at pH of 6.5 and 7.1 and complexes were allowed to stabilize 30 minutes in the pH-adjusted PBS before reading.

6.4 Results and Discussion

6.4.1 Depolymerization of Chitosan

By varying the amount of nitrous acid added to the different chitosans in solution (DDA ranging from 98 to 72%), we obtained chitosans with Mn close to our targets of 150, 80, 40 and 10 kDa (**Tableau 6.2**). According to the literature, depolymerization using nitrous acid does not change the degree of deacetylation since nitrous acid attacks the amine groups, but not the N-acetyl moieties, and subsequently cleaves the β -glycosidic linkages, with no side reactions (Allan and Peyron 1995).

6.4.2 *Determination of Transfection Conditions*

The mixing technique of chitosan and pDNA used to prepare nanoparticles, and the incubation conditions for transfection were first optimized using EGFP/flow-cytometric analysis of transfected cells (results not shown). The best mixing technique was found to be adding chitosan over pDNA, pipetting up and down a few times and tapping the tube gently, compared to mixing under more vigorous vortex agitation. As for pre-transfection incubation conditions, there was no observed difference with incubation times in the range of 30-120 minutes, and incubation without agitation was found to give better transfection than incubation under vigorous agitation (results not shown).

Prior to the analysis of the entire set of nanoparticles formulations using depolymerized chitosans, transfection parameters were optimized using only two chitosans selected in a pre-screening analysis (BST-80, 40 kDa and BST-72, 80 kDa). The N:P ratio of 2:1 with a transfection medium pH of 7.1 and 2.5 µg pDNA/well produced no transfected cells detectable by flow cytometry, while maximum transfection was found at 7:1 and 10:1 N:P ratios with a subsequent decrease at 15:1 (**Figure 6.1a**). These results are consistent with those in the literature where excess chitosan is mixed with pDNA and the optimal N:P ratio can vary with DDA and MW (Kiang, Wen et al. 2004).

Different pH of transfection media were tested, in the range of 6.5-7.4, remaining close to physiological values, even though some studies have reported transfection

below pH 6.5 (Roy 1999; Romoren, Pedersen et al. 2003; Koping-Hoggard, Varum et al. 2004). Comparable numbers of transfected cells were found for pH of 6.5 and 7.1, while a pH of 7.4 drastically lowered transfection for these chitosans used in our optimization experiments. (**Figure 6.1b**).

A dose-dependant increase in number of cells transfected was seen with the amount of pDNA/well, up to 2.5 $\mu\text{g}/\text{well}$ (**Figure 6.1c**), where the transfection efficiency reached a plateau. Based on these results we selected N:P ratios of 5:1 and 10:1, pH values of the transfection media of 6.5 and 7.1 as well as a dose of 2.5 μg of pDNA/well for further analysis of transfection using the library of depolymerized chitosans.

6.4.3 Complex Size

For most of the formulations tested, the size of the resulting complexes was found to be in the range 200-400 nm. However, 10 kDa chitosans led to the formation of larger complexes in the range of 600-1000nm (**Figure 6.2**). An increase in nanoparticle size for a 10 kDa chitosan has also been seen before (Huang, Khor et al. 2004). It was previously reported (Danielsen, Varum et al. 2004) that the reduction of length and charge of chitosan decreases its binding affinity to DNA and at sufficiently low MW, chitosan cannot fully condense DNA, consistent with our increased size for the complexes formed with 10 kDa chitosan (**Figure 6.2**). Our results indicate that DDA, MW, N:P ratio and pH do not significantly influence complex size as long as the chitosan is large enough ($\text{MW} > 10 \text{ kDa}$) to fully condense DNA. Danielsen *et al.* (Danielsen, Varum et

al. 2004) obtained similar results suggesting that the size of the DNA condensates is mostly determined by the properties of the particular DNA molecule. Polydispersity of the chitosan used to complex DNA could also have an effect on the size of the resulting particles. For example, the large polydispersity obtained for low DDA/low MW depolymerized chitosans (**Tableau 6.2**) suggests the presence of larger chains in these chitosan solution that could more effectively condense DNA and be responsible for some of the smaller particles seen with these low DDA/low MW chitosans (**Figure 6.2**).

6.4.4 *Complex Zeta Potential*

The zeta potential of the complexes was found to diminish with an increase of pH and to a lesser extent, with a decrease of chitosan's DDA, as expected (**Figure 6.3**). Molecular weight did not significantly affect the zeta potential and no noticeable differences were observed comparing N:P ratios 5:1 and 10:1 (**Figure 6.3**). As reported in several previous studies (Roy 1999; Ishii, Okahata et al. 2001; Mao, Roy et al. 2001), the zeta potential decreases when the pH rises, due to neutralization of amine groups on chitosan. The pKa of chitosan is reported to be ~ 6.5 (Anthonsen and Smidsrod 1995) and the ionization state of the polymer is thus particularly sensitive to pH changes in the vicinity of pH 6.5, explaining the significant reduction in zeta potential observed when pH rises from 6.5 to 7.1. There was also a slight increase of the zeta potential as DDA increased (**Figure 6.3**) due to the higher charge density of more deacetylated chitosans. Huang *et al.* (Huang, Khor et al. 2004) found similar influences of DDA and MW on the zeta potential of chitosan particles. At high N:P ratio such as 5:1 and 10:1, the zeta

potential appeared to reach a maximum as observed in previous studies (Mao, Roy et al. 2001; Kiang, Wen et al. 2004).

6.4.5 *In vitro Transfection*

The percentage of transfected cells determined by flow cytometry was found to depend significantly on the type of complexes used, where some formulations resulted in as high as 40% of cells being transfected, whereas others revealed no transfection at all (**Figure 6.4**). These results clearly demonstrate that transfection efficiency is highly sensitive to DDA, MW, N:P ratio and pH.

The level of luciferase expression was also found to vary strongly with the formulation parameters of the complexes. Many formulations resulted in levels of transgene expression approaching those of the positive controls (Lipofectamine™ and FuGENE 6). Most interestingly, two formulations at pH 6.5, namely 92-10-5 and 80-10-10 [DDA-MW-N:P ratio], were equivalent to our best positive control, FuGENE 6 (**Figure 6.5**), since no statistically significant difference could be detected. FuGENE 6 is known to be a highly efficient commercial vector for *in vitro* transfection, clearly indicating that complexes produced with these two chitosan-based formulations achieved particularly high levels of transgene expression.

Our results do not show a general tendency for the influence of DDA taken alone on gene expression in the range studied. Rather, when pH and N:P ratio are kept constant

(each graph in **Figure 6.5**), there always seemed to be an optimal DDA value for each particular molecular weight where gene expression was maximum, indicating a coupling effect between DDA and MW. It has been observed previously that gene expression is decreased when DDA goes from a value of 90% down to 61% or 46% (Huang, Fong et al. 2005) or down to 70% or 62% (Kiang, Wen et al. 2004), which can also be seen in our results for some formulations.

The molecular weight of chitosan in the range studied had either no effect on gene expression or increased gene expression when lower molecular weights were used, in a DDA dependent fashion (**Figure 6.5**). On the other hand, some formulations using a 10 or 40 kDa chitosan behaved oppositely at low DDA, low N:P ratio or high pH. This could have been due to reduced nanoparticle stability that dissociate too early since there is weaker binding between chitosan and DNA when DDA (Kiang, Wen et al. 2004; Huang, Fong et al. 2005) and N:P ratio (Romoren, Pedersen et al. 2003; Kiang, Wen et al. 2004) are decreased, as well as when pH is increased (Koping-Hoggard, Mel'nikova et al. 2003). There are, however, contradictory results in the literature where *in vitro* transfection or gene expression, in some cases was better using higher MW chitosans (MacLaughlin, Mumper et al. 1998; Kiang, Wen et al. 2004; Huang, Fong et al. 2005), versus other cases where lower MWs had better success (Ishii, Okahata et al. 2001; Lee, Nah et al. 2001; Sato, Ishii et al. 2001; Koping-Hoggard, Mel'nikova et al. 2003; Koping-Hoggard, Varum et al. 2004). Here again, these divergent results could be due to a coupling effect between formulation parameters.

The N:P ratio, as well as MW and DDA, has been found to be strongly correlated with the *in vitro* transfection efficiency of chitosan/DNA complexes on a fish cell line (EPC) (Romoren, Pedersen et al. 2003). In our study, there was an interaction between both MW/DDA and the N:P ratio, where a high MW/DDA chitosan gives high transfection at low N:P while a low MW/DDA is beneficial at higher charge ratio. The same coupling effect has been previously observed for the binding of DNA by chitosan (Kiang, Wen et al. 2004). In addition, our results show that some formulations resulting in low gene expression had a better response when the N:P ratio was increased from 5:1 to 10:1 (**Figure 6.5**).

A more acidic transfection medium, and hence a higher zeta potential, was correlated with an increase of transgene expression for most of the formulations (**Figure 6.5**). Moreover, as can be seen by comparing the percentage of cells transfected (**Figure 6.4**) and their level of transgene expression (**Figure 6.5**), a similar percentage of cells transfected observed at pH 6.5 versus 7.1 did not correspond to the same level of transgene expression. Luciferase expression was much greater at pH 6.5 versus 7.1 even though the percentage of transfected cells could be similar. By grouping data according to pH, we found a linear relationship between the luciferase expression and the percentage of cells transfected, for both pH values but with a much higher slope at pH 6.5 (**Figure 6.6**).

This direct correlation between lower pH and higher levels of gene expression has been found previously (Roy 1999; Sato, Ishii et al. 2001; Koping-Hoggard, Varum et al. 2004). Also, a higher surface charge was previously correlated with an increased cellular uptake and consequently, a higher percentage of transfected cells (Huang, Fong et al. 2005). In media of lower pH, the zeta potential of the complexes increases due to chitosan ionization, effectively increasing complex stability extracellularly and enhancing their binding to negatively charged cell membranes and subsequent uptake (Huang, Khor et al. 2004; Huang, Fong et al. 2005). Only 3 formulations did not behave in this manner, namely the complexes formed with chitosans of DDA = 98% and with MW of 120, 80 and 40 kDa that had higher luciferase expression level at pH 7.1 (**Figure 6.5**). However, microscopic observations revealed that cell morphology was altered after incubation with complexes using a 98% DDA chitosan at pH 6.5. Cytotoxicity of chitosan has been reported to increase with chitosan valence, or charge density (Ekrami and Shen 1995; Richardson, Kolbe et al. 1999), as would occur with higher DDA and lower pH. Some cytotoxicity may then appear for higher DDA and MW, particularly at acidic pH when these chitosans become more protonated. These findings are compatible with Huang *et al.* (2004) who found attenuated cytotoxicity of chitosan when DDA was decreased, and less attenuation when MW was reduced, suggesting that DDA has a greater effect than MW on cytotoxicity via its controlling effect on particle surface charge density (zeta potential) as seen with other cationic polymers (Chang, Westcott et al. 1987; Ekrami and Shen 1995).

Biodegradability is an additional factor that may influence cytotoxicity since high DDA chitosans are more difficult to degrade due to the requirement of sequential N-acetyl-glucosamine units for binding to chitosan-degrading enzymes (Aiba 1992). However, in our transfection experiments, the same complexes (DDA = 98% of MW 120, 80 and 40 kDa) used at a higher pH of 7.1 resulted in much better cell morphology and a higher level of expression, supporting a charge density-dependence influence on cytotoxicity rather than biodegradability.

Interestingly, some of the larger complexes were able to transfect HEK 293 cells quite efficiently and some of the smaller complexes were much less efficient, for example 92-10-5 [DDA-MW-N:P ratio] with a size of 770 nm vs. 92-80-5 with a size of 280 nm at pH 6.5, where these complexes have similar surface charge. These results suggest that small complexes are not necessarily required for efficient transfection. Results from Köping-Höggård *et al.* (Koping-Hoggard, Tubulekas *et al.* 2001) also support this notion since transfection efficiency was not affected by different sizes of complexes (200-600 nm) obtained with the same formulation parameters (in their study, by decreasing chitosan and plasmid concentration at constant N:P ratio). Additional literature also suggests that the size of nanoparticles does not appear to be a dominant factor in cellular uptake (Huang, Khor *et al.* 2004; Huang, Fong *et al.* 2005).

6.4.6 *Coupling of Formulation Parameters in Determining Transfection Efficiency*

The combined effect of the formulation parameters (DDA, MW, pH, N:P ratio) is synthesized in **Figure 6.7**. The numerous experiments with chitosan library allowed us to produce contour plots of normalized transgene expression as a function of DDA and MW for each pair of (pH, N:P ratio) tested. In each graph, transgene expression was normalized to the highest level of expression achieved at the corresponding (pH, N:P ratio) pair in order to specifically highlight the influence of DDA and MW. Interestingly, it appears that maximum transgene expression occurs for DDA:MW values that run along a diagonal from high DDA/low MW to low DDA/high MW. The exact location of this diagonal changes for different (pH, N:P ratio) pairs. Thus if one decreases/increases DDA, one must correspondingly increase/decrease MW to maintain maximal transgene expression. We also observe that for a given DDA, a change in pH from 6.5 to 7.1 displaces the MW for the most efficient formulations towards higher MW. This could be due to the destabilizing effect of a pH increase where chitosan charge is reduced, thus needing a higher MW to effectively bind DNA. On the other hand, for a given DDA, a change in N:P ratio from 5:1 to 10:1 displaces the MW for the most efficient formulations towards lower MW, again probably because of the stabilizing effect of increasing chitosan concentration (N:P ratio).

6.4.7 Formulation Parameters May Primarily Affect Transfection Efficiency by Modulating Nanoparticle Stability

In view of our results and previous studies, it appears that stability of nanoparticle complexes may be central to describe the effect of the formulation parameters (DDA, MW, N:P ratio and pH of transfection medium) on the level of transgene expression. It is already recognized in the literature that complexes that are not sufficiently stable will dissociate too early and will show little or no transgene expression. On the other hand, highly stable complexes might not release DNA once inside the cells or will release it slowly, resulting in low or delayed expression (MacLaughlin, Mumper et al. 1998; Koping-Hoggard, Tubulekas et al. 2001), thus an intermediate stability is desired. The following statements summarize the predicted effects of formulation parameters on nanoparticle stability that are compatible with our transfection efficiency results and with those already present in the literature. One limitation of the current study is that we did not directly assess particle stability so that this aspect requires further experiments. However the following discussion synthesizes our results with stability assessments taken from the literature to provide a rational and coherent interpretation of our transfection results.

The DNA binding capacity of chitosan increases as its DDA increases to create a higher charge density along the chain. This DDA-dependant binding affinity is clearly shown in gel electrophoresis assays where low DDA chitosans form physically unstable complexes that fail to completely retain DNA (Koping-Hoggard, Tubulekas et al. 2001;

Kiang, Wen et al. 2004; Huang, Fong et al. 2005). Increasing steric hindrance from bulky N-acetyl group of lower DDA chitosan might also contribute to this reduction of the binding capacity. According to Köping-Höggård *et al.* (Köping-Höggård, Tubulekas et al. 2001), the degree of deacetylation must exceed 65% in order to obtain stable complexes with pDNA that transfect target cells in vitro.

High DDA chitosans degrade slowly in the cell. DDA also exerts a dominant influence on biodegradability where high DDA chitosans are difficult to degrade (Aiba 1992). The rate of enzymatic degradation of chitosan by lysozyme increases proportionally to the degree of acetylation (DA) to the fourth power (Nordtveit, Varum et al. 1994; Nordtveit, Varum et al. 1996). In this light, Köping-Höggård *et al.* (Köping-Höggård, Tubulekas et al. 2001) suggested that endosomal escape of high MW chitosan-based complexes depended on enzymatic-degradation of chitosan, rather than a proton buffering capacity, that would occur less readily with high DDA chitosans. The resulting degradation fragments (oligo- and mono-saccharides) are hypothesized to increase endosome osmolarity and lead to membrane rupture. Thus, for highly deacetylated chitosan, reduced degradability could impede or delay endosomal escape and possibly delay expression.

The DNA binding capacity of chitosan increases as its MW increases. Binding affinity and complex formation between oppositely charged macromolecules is strongly dependant on the valence of each molecule, with a low valence yielding only weak

binding (Danielsen, Varum et al. 2004). The reduction in chitosan valence at lower MW has been shown to reduce its binding affinity for DNA (Koping-Hoggard, Mel'nikova et al. 2003). Although complex stability is desirable for protection against nucleases extracellularly, MacLaughlin *et al.* (MacLaughlin, Mumper et al. 1998) suggested that high MW chitosan may form complexes that are too stable to transfect cells since they may not be disassembled once inside the cell. Along these lines, Köping-Höggård *et al.* (Koping-Hoggard, Tubulekas et al. 2001) found that these more stable complexes could permit gene expression after a relatively long period of time, suggesting that such “highly stable” formulations (high MW yet low DDA to be degradable) may release the plasmid several days post-transfection, resulting in delayed expression.

Increasing the N:P ratio enhances chitosan binding to DNA. For the same DDA, a lower MW chitosan requires a higher N:P ratio to completely condense DNA. Similarly at equal MW, a lower DDA requires a higher N:P ratio to completely condense DNA (Koping-Hoggard, Tubulekas et al. 2001; Kiang, Wen et al. 2004). There is an optimal range for the N:P ratio values specific to the chitosan used because using a N:P ratio that is too low will yield physically unstable complexes and poor transfection, while overly stable complexes prepared at a too high N:P ratio may also show reduced transfection (Koping-Hoggard, Tubulekas et al. 2001; Sato, Ishii et al. 2001; Koping-Hoggard, Mel'nikova et al. 2003).

Reduction of pH increases the surface charge of the nanoparticles and increases chitosan binding affinity to DNA. The DNA binding capacity of chitosan increases as pH decreases to create a higher charge density along the chain (Koping-Hoggard, Mel'nikova et al. 2003). It has been shown that uptake of chitosan-DNA complexes depends strongly on their surface charge or zeta potential (Huang, Fong et al. 2005). An acidified medium increases the zeta potential of the complexes, enhancing binding efficiency to the cell membrane and uptake, while also possibly reducing aggregation of the complexes with increased electrostatic repulsion. Thus, chitosan complexes are in general more stable and more efficient to transfect cells in slightly acidic medium.

6.4.8 Combined Effects of the Formulation Parameters

By considering the combined effects of the formulations parameters described above, it is expected that complexes formed with a low MW, low DDA chitosan would not be sufficiently stable to transfect cells efficiently. On the other hand, complexes formed with high MW, high DDA would be highly stable and may lead to low or delayed transfection. It appears that there is a range of intermediate values of MW, DDA that form complexes of intermediate stability and that transfect efficiently as indicated by our results (**Figure 6.5**). This specific range can change when the N:P ratio and pH are varied as these parameters also affect *in vitro* transfection. For example it is expected that an increase of the N:P ratio or a decrease of pH will permit efficient transfection with chitosan of lower MW/DDA. These trends were also apparent in our results (**Figure 6.7**) as detailed in section 3.5.

6.5 Conclusion

The wide range of formulations tested in this study allowed us to reveal mechanistic influences of the formulation parameters on the level of transgene expression. Maximum transgene expression occurred for DDA:MW values that run along a diagonal from high DDA/low MW to low DDA/high MW. Moreover, several chitosan/pDNA complex formulations achieved levels of transgene expression approaching those of the positive controls (Lipofectamine[™] and FuGENE 6), while two optimal conditions (92-10-5 and 80-10-10 [DDA-MW-N:P ratio] both at pH 6.5) were particularly effective, showing equivalent transfection efficiency compared to our best positive control. These findings provide important guideposts for determining parametric formulations and further development of chitosan/pDNA complexes for use in therapeutic gene transfer applications.

6.6 Acknowledgements

This work was supported by NanoQuébec and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). Marc Lavertu received a doctoral scholarship from Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and Fonds pour la formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR).

Tableau 6.1. Physicochemical Characteristics of Bulk Chitosans

Chitosans	Degree of deacetylation, DDA (%) ^a	Number – average molecular weight, M_n (kDa) ^b	Polydispersity, P_d (M_w/M_n)
BST-98	98	120	1.5
BST-92	92	200	1.4
BST-80	80	320	1.5
BST-72	72	220	1.5

^a Determined by ¹H NMR.^b Determined by gel permeation chromatography.**Tableau 6.2.** Physicochemical Characteristics of Depolymerized Chitosans

Chitosans DDA (%) ^a	Number –average molecular weight M_n (kDa) ^b	Polydispersity, P_d (M_w/M_n)
BST-98 98%	120 ^c	1.5
	79	1.6
	39	1.6
	11	1.6
BST-92 92%	151	1.4
	80	1.5
	38	1.6
	8	1.8
BST-80 80%	153	1.6
	93	2.0
	38	2.6
	11	3.6
BST-72 72%	185	2.3
	86	3.5
	39	4.0
	12	7.0

^a Determined by ¹H NMR.^b Determined by gel permeation chromatography.

^c Not depolymerized, since this bulk chitosan has a M_n of 120 kDa.

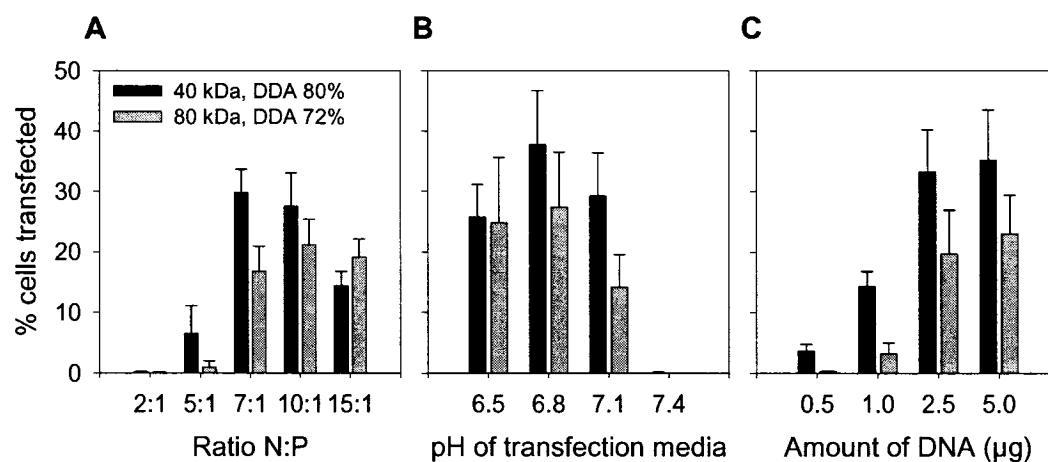


Figure 6.1. Percentage of HEK 293 cells that were transfected *in vitro* using complexes made with chitosans BST-80 (40 kDa) and BST-72 (80 kDa). Cells were incubated 48 hours in 24-well culture plates with complexes at A) Different amine:phosphate (N:P) ratios with fixed 2.5 μg of pDNA/well and fixed transfection media pH of 7.1; B) Different pH with fixed N:P ratio of 7:1 and fixed 2.5 μg of pDNA/well; C) Different amounts of pDNA/well with fixed pH of 7.1 and fixed N:P of 7:1. Mean ± SD (n= 4-5).

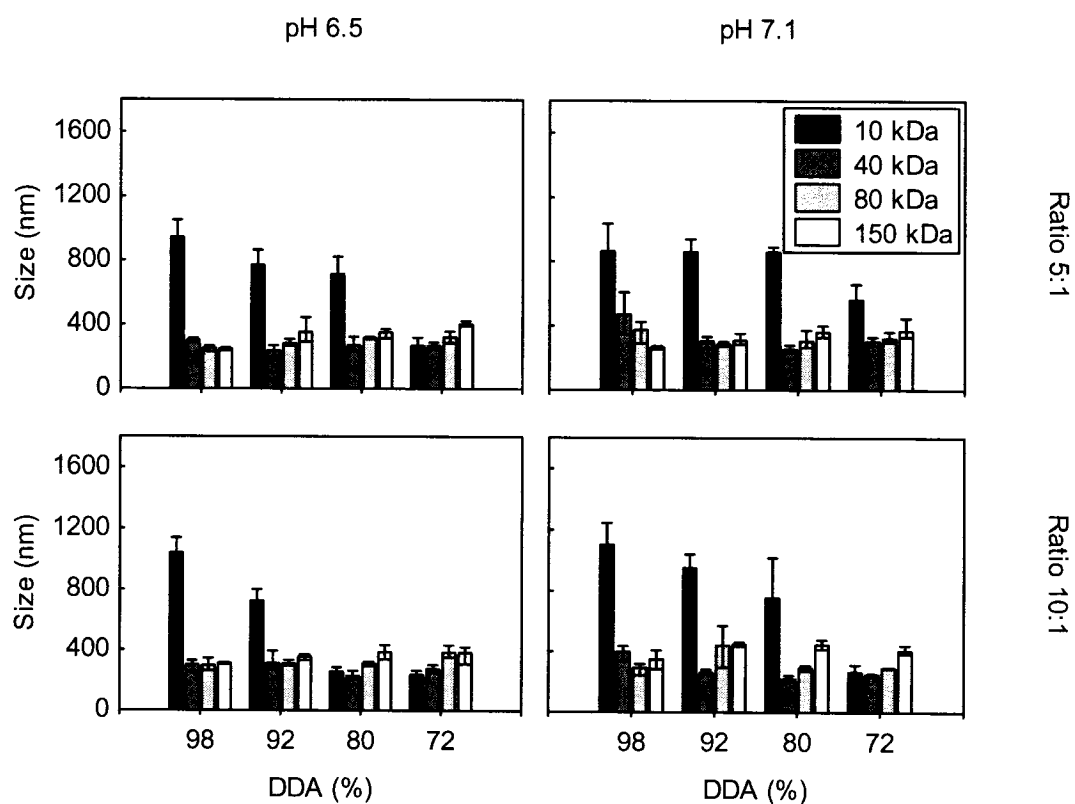


Figure 6.2. Size of chitosan/pDNA complexes made with chitosans of different degrees of deacetylation and molecular weights. Two different N:P ratios were used (5:1 and 10:1) as well as two different pH (6.5 and 7.1) of the suspension buffer (PBS) in which size was measured. Mean with error bar showing minimum and maximum.

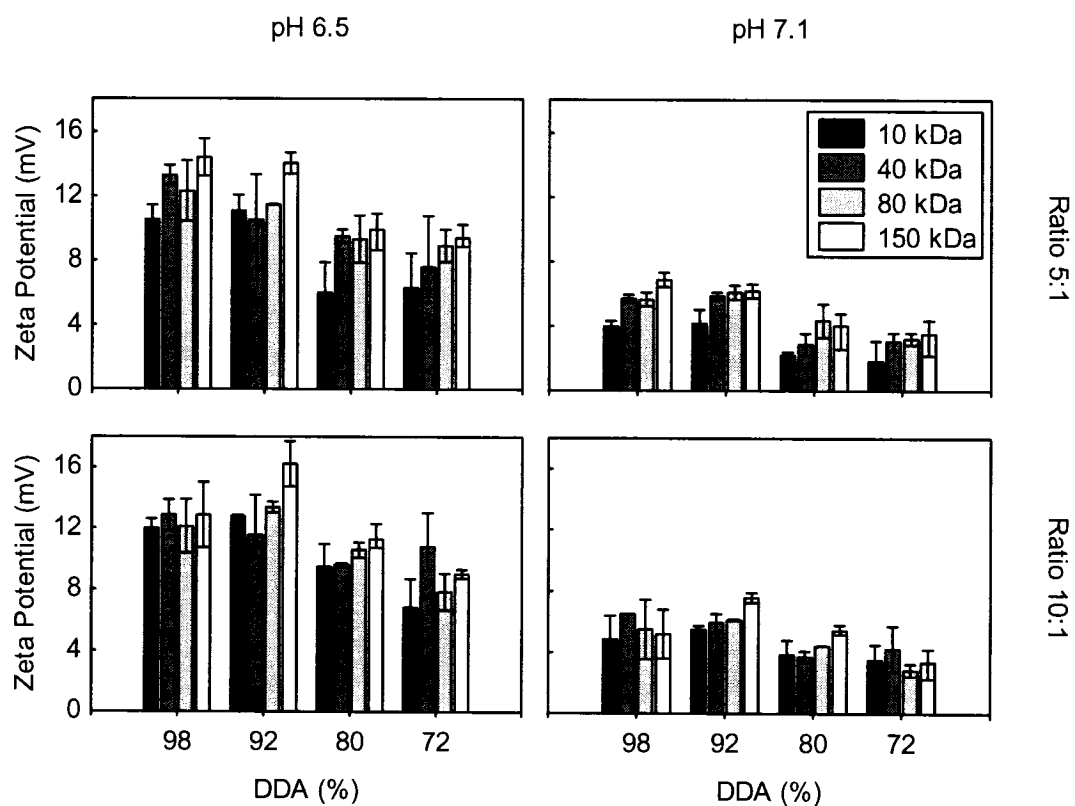


Figure 6.3. Zeta potential of chitosan/pDNA complexes made with chitosans of different degrees of deacetylation and molecular weights. Two different N:P ratios were used (5:1 and 10:1) as well as two different pH (6.5 and 7.1) of the suspension buffer (PBS) in which zeta potential was measured. Mean with error bar showing minimum and maximum.

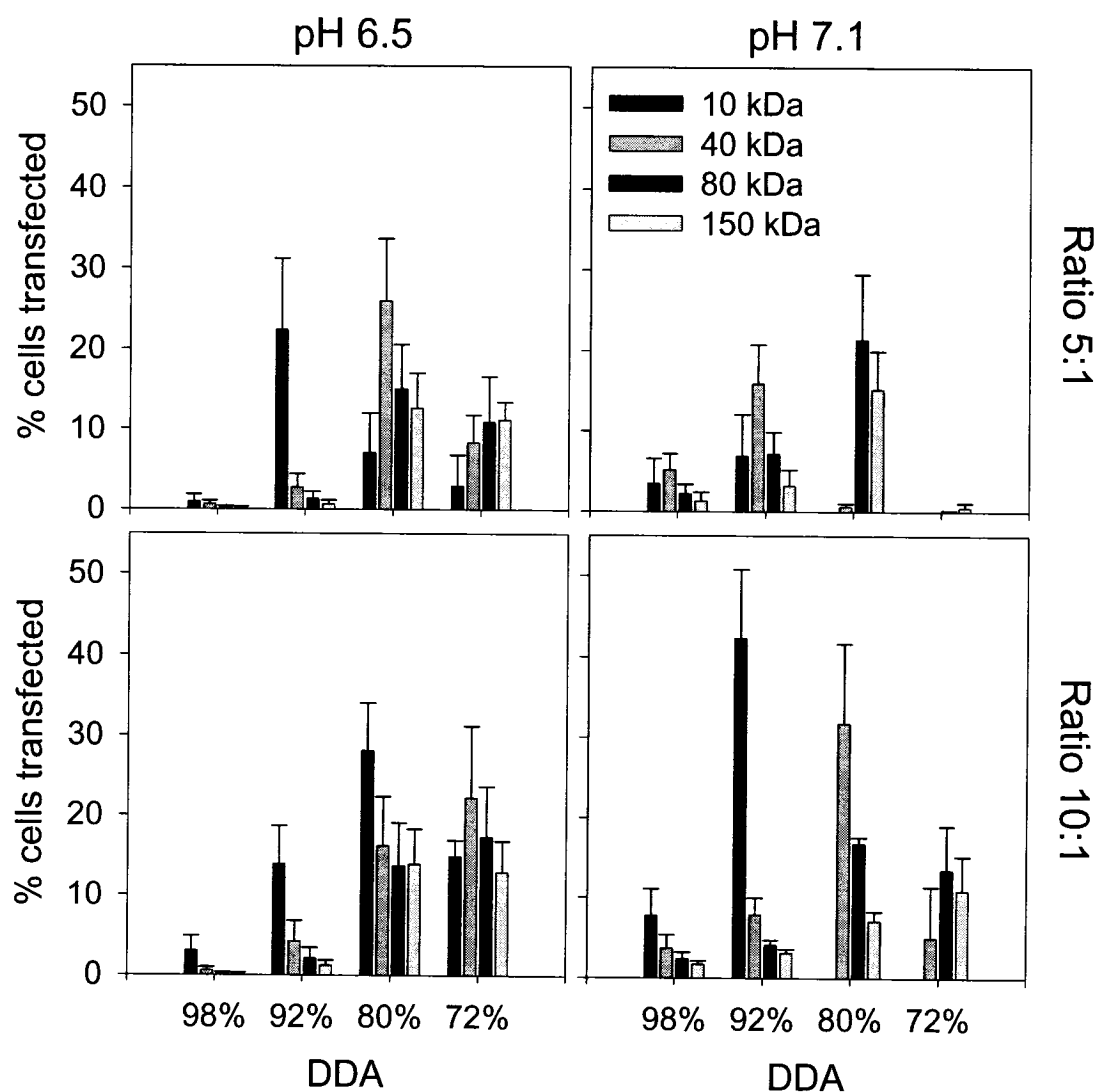


Figure 6.4. Percentage of HEK 293 cells that were transfected *in vitro* using complexes made with chitosans of different degrees of deacetylation and molecular weights. Cells were incubated for 48 hours in 24-well culture plates with complexes made with amine:phosphate ratios of 5:1 and 10:1, using transfection media pH of 6.5 and 7.1 as

well as fixed 2.5 μg of pDNA/well. FuGENE 6, the positive control resulted in $77.7 \pm 2.6\%$ at pH 6.5 and $82.6 \pm 2.3\%$ at pH 7.1. Mean $\pm$ SD (N=5).

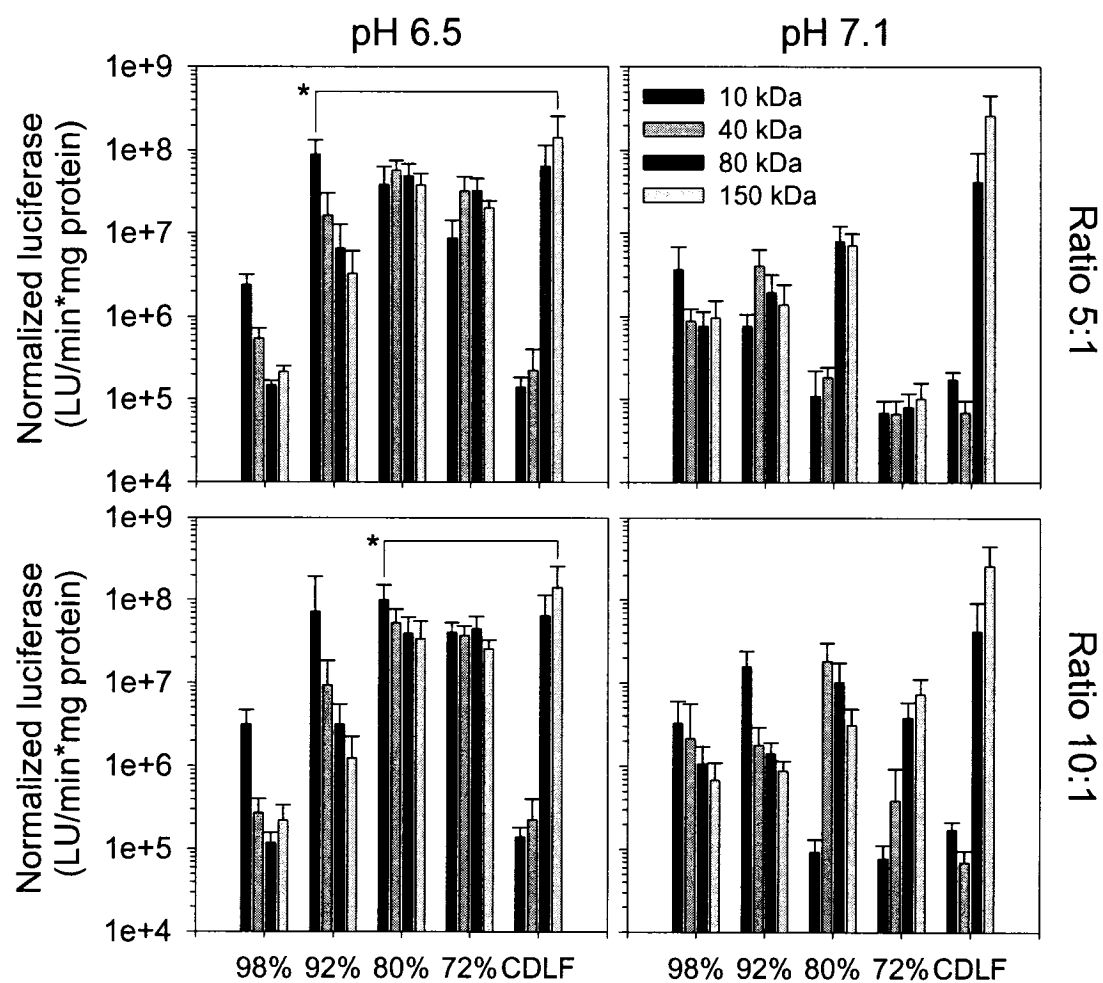


Figure 6.5. Transgene expression by HEK 293 cells transfected *in vitro* using complexes made with chitosans of different degrees of deacetylation and molecular weights. Cells were incubated for 48 hours in 24-well culture plates with complexes made with amine:phosphate ratios of 5:1 and 10:1, using transfection medium pH of 6.5

and pH 7.1, and fixed 2.5 µg of pDNA/well. The relative light units (RLU) were normalized to the protein content of each sample. The different formulations were compared to control cells (C), pDNA alone (D) as a negative control as well as Lipofectamine[™] (L) and FuGENE 6 (F) as positive controls. An asterix (*) indicates similar expression levels since a Mann-Whitney test with $p=0.05$ showed no significant difference. Mean $\pm$ SD (N=4-6).

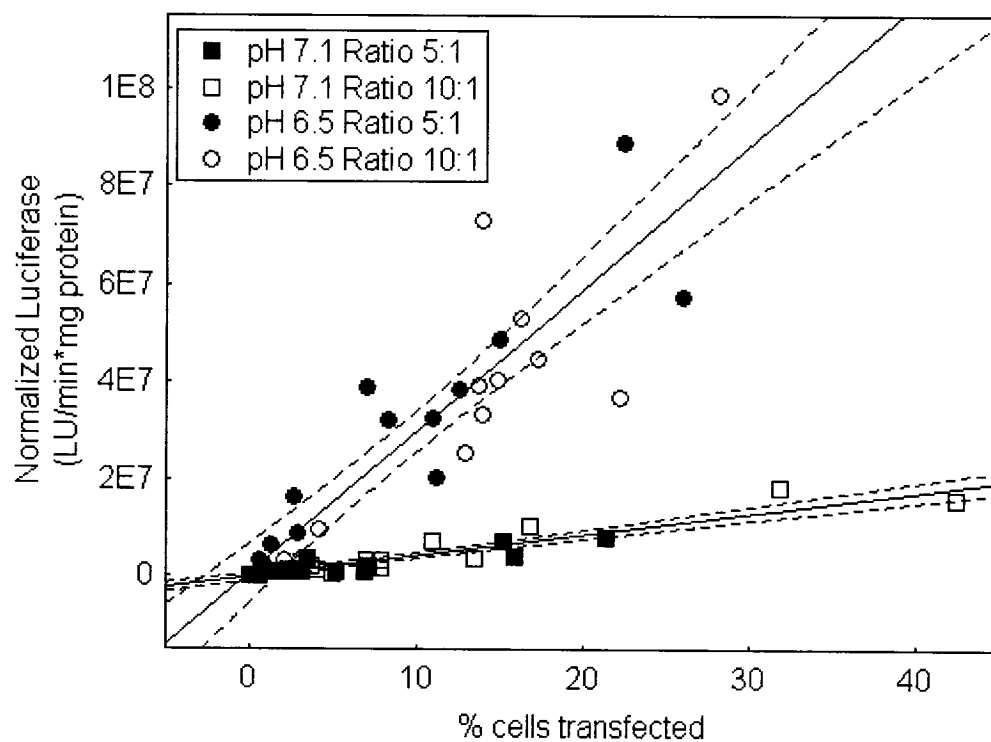


Figure 6.6. Transgene expression quantified by a luciferase assay correlated with the percentage of transfected cells measured by flow cytometry detection of GFP using a plasmid containing both reporters. The pH of the transfection medium needs to be accounted for when relating these two parameters. Linear Regression resulted in Pearson product moment correlation coefficients of 0.91, $p < 0.0001$ (pH 6.5) and 0.94, $p < 0.0001$ (pH 7.1). Dashed lines display 95% confidence intervals.

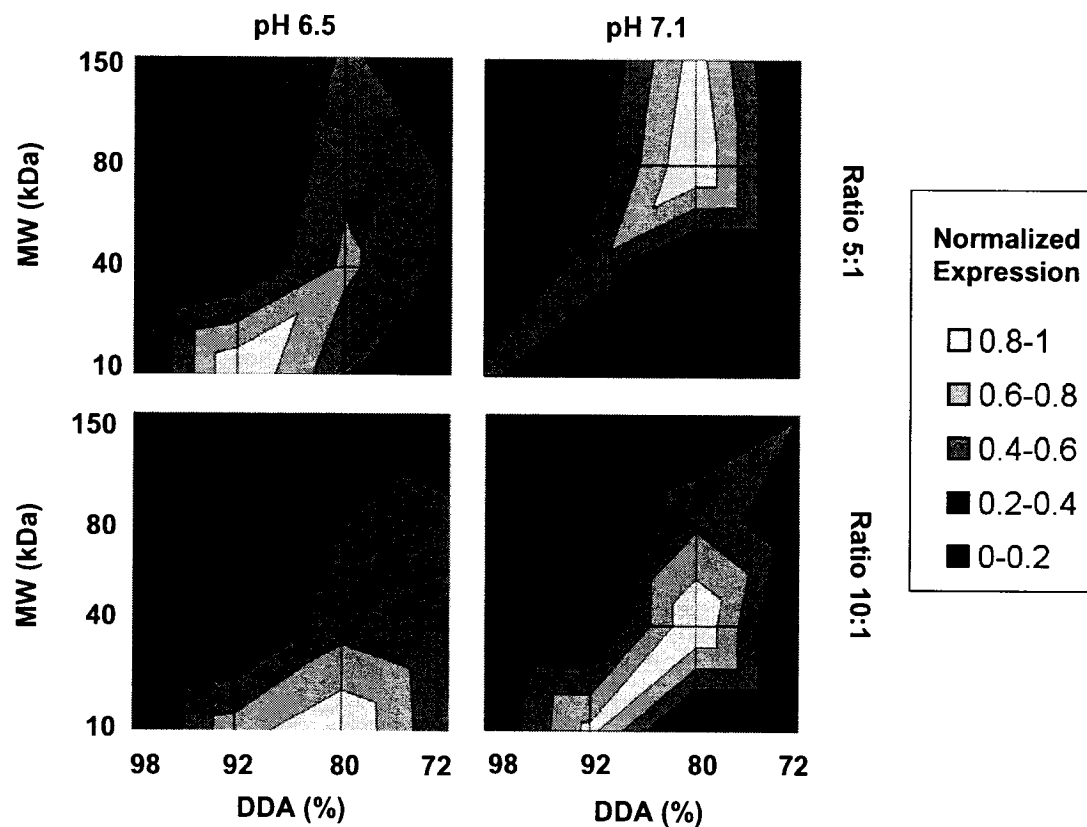


Figure 6.7. Contour plot of normalized transgene expression of HEK 293 cells as a function of degree of deacetylation (DDA) and molecular weight (MW) of chitosans used to make complexes. In each plot, transgene expression was normalized to the highest expression level obtained with this particular N:P ratio and transfection medium pH.

CHAPITRE 7 : DISCUSSION GÉNÉRALE

Notre première étude (CHAPITRE 3) avait pour objectif la validation d'une méthode de mesure du DDA du chitosane par RMN du proton. Le DDA est un paramètre qui influence fortement les propriétés physiques et biologiques du chitosane. Nous avons démontré que cette technique est précise puisqu'elle permet de déterminer le DDA avec une erreur de l'ordre de 1% ou mieux. L'utilisation de cette technique nous a permis de connaître avec précision la concentration de monomères glucosamine des solutions utilisées dans des expériences de titrage (CHAPITRE 4) et dans l'étude de la précipitation dans le système chitosane-GP (CHAPITRE 5). La technique n'est limitée que par la solubilité du chitosane et nous croyons que cette méthode devrait être utilisée pour caractériser tout chitosane soluble.

La deuxième étude (CHAPITRE 4) avait pour objectif la caractérisation du comportement acide-base du chitosane et le développement d'un modèle théorique pour le calcul de la constante de dissociation du chitosane (pK_{ap}). Des chitosanes de DDA de 0.72, 0.85 et 0.98 caractérisés par RMN du proton selon la méthode proposée dans le CHAPITRE 3 ont été utilisés. Cette étude a permis d'évaluer l'effet du DDA, de la concentration de sel ajouté et de la concentration de chitosane sur la constante de dissociation apparente, le pK_{ap} . Nous avons observé que le pK_{ap} 1) augmente fortement lorsque la concentration du sel augmente 2) augmente fortement avec l'augmentation de la concentration de chitosane pour de faibles concentrations de sel ajouté 3) diminue

légèrement avec le DDA. Le degré d'ionisation (α) du chitosane à la précipitation suite à l'ajout d'une base forte (NaOH) a été mesuré et se situe dans une plage de valeurs allant de 0.25 à 0.55. Nous avons observé que la valeur de α à la précipitation augmente fortement avec le DDA. Cet effet du DDA semble être dû au fait que les groupes acétyle empêchent l'association chaîne-chaîne et un niveau d'ionisation plus faible pour les valeurs de DDA plus faibles est requis pour induire la précipitation. Cette diminution de la solubilité du chitosane avec l'augmentation du DDA a été rapportée par Varum et al. (Varum, Ottoy et al. 1994) et nous l'avons aussi observée dans le système chitosane-GP (CHAPITRE 5).

Nous avons démontré que le modèle de Poisson-Boltzmann dans la cellule cylindrique décrit très bien le pK_a du chitosane avec une valeur du rayon du polyélectrolyte de 1.3 nm. Ce modèle permet de prédire l'effet du DDA, de la concentration de sel et de la concentration de chitosane. Cette étude a permis de déterminer que le pK_a intrinsèque (pK_0) du chitosane est de l'ordre de 6.6 (6.7 en présence de 150 mM NaCl) et qu'il est indépendant du DDA pour des valeurs de DDA allant de 72 à 100%. Cette étude a aussi démontré l'importance de détecter la présence de précipités dans les solutions de chitosane titrées afin d'améliorer la précision de la valeur de pK_0 déterminée par extrapolation.

Un des principaux objectifs de la thèse était de mieux comprendre le mécanisme de gélification induite par chauffage dans le système chitosane-GP. En nous appuyant sur

les résultats de la caractérisation du comportement acide-base du chitosane, nous avons étudié la précipitation de solutions de chitosane-GP. Les résultats obtenus, présentés sous la forme d'un article au CHAPITRE 5, suggèrent que la précipitation/gélification est bien due à une neutralisation du chitosane par transfert de protons et non pas à une intensification des interactions hydrophobiques avec la température tel que proposé dans deux études antérieures (Chenite, Buschmann et al. 2001; Cho, Heuzey et al. 2005). Ce transfert de protons est rendu possible par la forte diminution du pK_0 du chitosane avec la température et la quasi-invariabilité du pK_a du GP avec la température (Filion 2005; Filion, Lavertu et al. 2006; Filion, Lavertu et al. 2007).

Nous avons démontré que c'est la force de répulsion électrostatique qui est la plus fortement modulée par la température dans ce système. Par exemple, la valeur du degré d'ionisation, α , du chitosane lors du chauffage d'une solution avec $c_g = 1.5$ mM, $f_D = 0.72$, $c_{GP} = 5$ mM et $c_{NaCl} = 150$ mM passe de 0.55 à 0.17. Cette variation, prédite théoriquement et vérifiée par des mesures de RMN du phosphore, mène à une diminution considérable de l'énergie de répulsion entre les double-couches. Pour le cas simplifié de deux surfaces s'approchant l'une de l'autre avec un potentiel de surface qui soit à la fois faible (i.e. pour c_{NaCl} élevé et/ou α faible) et constant, l'équation de Poisson-Boltzmann peut être linéarisée et l'énergie de répulsion électrostatique est proportionnelle à α^2 (Evans 1998). Cette énergie électrostatique augmente quasiment de façon linéaire avec la température en raison de la variation particulière de la permittivité de l'eau avec la température. Ainsi, la répulsion électrostatique inter-chaîne est

approximativement proportionnelle à $T\alpha^2$ de telle sorte qu'un changement de α de 0.55 à 0.17 correspond à une réduction considérable de la répulsion électrostatique à environ 1/10 de sa valeur initiale, prouvant que la répulsion électrostatique est la force déterminante pour la solubilité/précipitation du chitosane dans ce système.

Nous avons développé un modèle théorique basé sur celui utilisé pour décrire le titrage du chitosane qui est en mesure de prédire l'évolution du degré d'ionisation du chitosane avec la température dans le système chitosane-GP. Nous avons démontré que la valeur du degré d'ionisation à la précipitation varie peu avec la température et que le modèle théorique basé sur l'équation de Poisson-Boltzmann permet de prédire la température de précipitation de mélanges de chitosane-GP de compositions variables. Un autre résultat important de cette étude est l'observation de la précipitation induite par chauffage dans des solutions comprenant du phosphate inorganique ou de MES. Ces résultats démontrent que la caractéristique principale de la base ou l'acide jumelé au chitosane est sa capacité à absorber les protons du chitosane lors de l'augmentation de la température. La compréhension du mécanisme de gélification pourrait être utilisée pour concevoir des systèmes thermosensibles composés d'un polyélectrolyte hydrophobe et d'un acide ou d'une base dont les dépendances en température des pK_a diffèrent.

Nous tenons ici à apporter une précision concernant le degré d'ionisation à la précipitation (α_p) du chitosane dans le système chitosane-GP. Lors d'une augmentation de température, une solution de chitosane-GP passe progressivement d'une solution

stable dans laquelle la répulsion inter-chaîne est suffisante pour maintenir le chitosane en solution, à une solution instable où l'agrégation survient. Ce passage est progressif et la cinétique de formation des précipités est dépendante de α et du taux de variation de α . Si l'on chauffe le système à une vitesse plus lente (dT/dt plus petit), on devrait observer une précipitation à une température plus faible car on accorde « plus de temps » au système pour que se forme des précipités. Ainsi, nous avons observé que la température de précipitation diminue de quelques degrés Celsius dans des rampes de température effectuées à 0.1 °C/min (résultats non présentés).

Un sujet qui n'a pas été abordé dans le CHAPITRE 5 est la réversibilité partielle de certaines formulations de chitosane-GP observée par Chenite et al. (Chenite, Buschmann et al. 2001). Chenite et al. ont observé que les formulations qui gélifiaient à température élevée présentaient une réversibilité partielle lorsque refroidies. Ces formulations présentaient des pH initiaux faibles (i.e. α initial élevé), en accord avec le mécanisme proposé et confirmé au CHAPITRE 5. Cette influence de la composition des solutions sur la réversibilité peut être expliquée par le mécanisme de gélification par transfert de protons. En effet, les formulations de pH initial plus faible doivent être chauffées à des températures plus élevées pour induire la gélification et le degré d'ionisation final après refroidissement de telles formulations sera donc plus élevé, facilitant la redissolution du chitosane, d'où la réversibilité partielle observée.

Un autre objectif de cette thèse était de vérifier l'influence du degré de désacétylation du chitosane et de son poids moléculaire sur son efficacité de transfection. Les résultats d'une étude *in vitro* présentée au CHAPITRE 6 dans laquelle 16 chitosanes (4 DDA x 4MW) ont été testés suggèrent un effet combiné du DDA et du MW sur la stabilité des complexes et sur son efficacité de transfection. Ces résultats sont en accord avec notre hypothèse selon laquelle la stabilité est déterminante pour la transfection. Ces effets sont particulièrement visibles lors de transfections effectuées à pH 7.1.

La dégradabilité du chitosane est aussi susceptible d'être déterminante pour son efficacité de transfection. Si le mécanisme de rupture de l'endosome est bien une augmentation de l'osmolarité par les produits de dégradation enzymatique du chitosane tel que proposé par Koping-Hoggard et al. (Koping-Hoggard, Tubulekas et al. 2001), des chitosanes fortement désacétylés devraient s'échapper difficilement de l'endosome/lysosome. Rappelons que le taux de dégradation initial du chitosane avec le lysozyme est proportionnel à $(1-f_D)^{4.5}$. Nous avons observé que les chitosanes de poids moléculaires supérieurs à 10 kDa et de DDA de 92 ou 98% sont peu efficaces pour la transfection. Ces résultats pourraient être liés à la faible dégradabilité de ces chitosanes et des études d'internalisation par microscopie confocale sont en cours afin de vérifier si ces chitosanes de DDA élevé demeurent confinés dans les lysosomes. Bien sûr, les études *in vitro* comportent des limitations quand vient le temps d'extrapoler vers des systèmes physiologiques, mais nous croyons que le contrôle de la stabilité par la

variation du poids moléculaire et du degré de désacétylation sera aussi déterminante *in vivo*.

Une limitation de cette étude est que la stabilité des complexes n'a pas été mesurée directement. Cependant, des essais de compétition avec des polyanions de densité de charge variable démontrent que les complexes formés par le chitosane et l'ADN plasmide sont d'autant plus stables que le degré de désacétylation et le poids moléculaire du chitosane sont élevés (Ma). Ces résultats sont aussi rapportés dans la littérature (Strand, Danielsen et al. 2005). Une autre limitation potentielle de notre étude est la polydispersité élevée de certains chitosanes (par exemple, le chitosane avec MW = 10 kDa et DDA = 72% ou 80%). Il semble que cette polydispersité soit due à la présence d'une composante de haut poids moléculaire s'apparentant à de la chitine qui résiste à la dépolymérisation à l'acide nitreux (Danion). Ainsi, même si présente en faible quantité, cette composante de haut poids moléculaires contribue à la polydispersité élevée dans les chitosanes de faible MW et de faible DDA. Ottoy et al. ont rapporté cette hétérogénéité dans des chitosanes commerciaux préparés par désacétylation hétérogène et ont observé qu'elle diminuait avec l'augmentation du DDA, i.e. avec le temps de traitement au NaOH (Ottoy, Varum et al. 1996). Ils ont attribué cette hétérogénéité au mécanisme de désacétylation qui s'effectue de l'extérieur vers l'intérieur des particules de chitine.

CHAPITRE 8 : CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

La première partie de ce travail de recherche a permis de confirmer que la gélification dans le système chitosane-GP est due à un transfert de protons du chitosane vers le GP et non pas à une intensification des interactions hydrophobiques avec la température. Pour parvenir à valider ce mécanisme, nous avons caractérisé le comportement acide-base du chitosane et proposé un modèle basé sur l'application de l'équation de Poisson-Boltzmann dans la cellule cylindrique. Ce modèle permet de bien décrire les effets du DDA, de la concentration de sel ajouté et de la concentration de chitosane sur la constante de dissociation de ce dernier. Il permet aussi de prédire la température de précipitation dans le système chitosane-GP et constitue donc un outil très utile pour la mise au point de gels de chitosane avec des propriétés de gélification désirées et couvrant une large gamme de températures de gélification. Ce mécanisme pourrait aussi être mis à profit pour la formation de gel à partir d'autres polyélectrolytes hydrophobes.

Le chitosane étant un polyélectrolyte, son comportement en solution ainsi que sa solubilité sont contrôlés par son degré d'ionisation. Nous croyons que la caractérisation du comportement acide-base qui a permis la détermination ainsi que la modélisation de $pK_{ap}(\alpha)$ sera utile pour déterminer la valeur du degré d'ionisation du polymère utilisé dans diverses conditions et permettra un contrôle accru des propriétés de solutions à base de chitosane. Un point intéressant qui ressort de notre travail est la difficulté de déterminer ou définir une propriété comme la solubilité du chitosane. Cette propriété

dépend non seulement du DDA, du MW, de la concentration de sel ajouté, de la concentration de chitosane, de la façon dont a été préparée le chitosane (désacétylation hétérogène vs désacétylation homogène), mais aussi de la façon dont le pH de la solution de chitosane est ajusté (ajout d'une base forte vs ajout d'une base faible). Ainsi, les valeurs du degré d'ionisation à la précipitation obtenues dans des expériences de titrage avec du NaOH et des rampes de température sur des solutions de chitosane-GP diffèrent considérablement. Cette différence est due à la présence de précipités locaux créés lors de l'injection d'une base forte telle que le NaOH.

La deuxième partie de ce travail a permis de mettre en évidence l'influence combinée du poids moléculaire et du degré de désacétylation du chitosane sur son efficacité de transfection. Les résultats suggèrent que la stabilité des complexes de chitosane-ADN est déterminante pour l'efficacité de transfection et qu'elle est contrôlée par le DDA et le MW. L'influence observée du DDA et du MW sur l'efficacité de transfection pourrait guider la synthèse de nanoparticules chitosane-ADN avec des propriétés spécifiques requises pour diverses applications ou diverses voies d'administration. Ces effets du DDA et du MW pourraient être mis à profit en les combinant aux diverses stratégies couramment utilisées pour améliorer l'efficacité des vecteurs non-viraux (i.e. utilisation de ligands, de peptides NLS, de peptides endosomolytiques et stabilisation stérique).

8.1 Recommandations

Voici quelques recommandations en guise de conclusion finale à ce travail :

- Le DDA de tout chitosane soluble devrait préférablement être déterminé par RMN du proton pour une mesure précise de ce paramètre.
- On devrait tenir compte de l'effet de la concentration du chitosane lorsqu'on rapporte son pK_a pour des solutions sans sel ajouté. On devrait éviter de procéder à une extrapolation linéaire du pK_{ap} pour déterminer le pK_0 du chitosane dans des solutions sans sel ajouté. Une telle extrapolation sous-estime la valeur du pK_0 .
- Lors d'expériences de titrage du chitosane, la détection de la précipitation devrait se faire à l'aide d'une technique sensible afin de s'assurer de la validité de l'analyse des résultats qui dépend de l'homogénéité de la solution.
- Le domaine de la livraison de gènes avec le chitosane bénéficierait grandement de la disponibilité de chitosanes de grande pureté et de poids moléculaire et de DDA bien définis. Il serait très avantageux qu'une compagnie puisse fournir une librairie de chitosanes de structure définie avec une large gamme de DDA et de MW afin de permettre une meilleure comparaison entre les nombreuses études publiées dans ce domaine.

ANNEXE I Démonstration de $\text{dp}K_{\text{ap}} \cong \text{dpH}$

La constante de dissociation apparente du monomère glucosamine du chitosane est donnée par

$$K_{\text{ap}} = \frac{c_{\text{H}^+} c_{\text{g}}^{\text{n}}}{c_{\text{g}}^+} = \frac{c_{\text{H}^+} (1 - \alpha)}{\alpha} \Rightarrow \ln K_{\text{ap}} = \ln(1 - \alpha) - \ln \alpha + \ln c_{\text{H}^+}$$

Eq 8.1

où c_{g}^+ est la concentration de monomère glucosamine ionisé, c_{g}^{n} est la concentration de monomère glucosamine neutre, $c_{\text{g}}' = c_{\text{g}}^+ + c_{\text{g}}^{\text{n}} = f_{\text{D}} c_{\text{p}}$ est la concentration totale de monomère glucosamine et $\alpha = \frac{c_{\text{g}}^+}{c_{\text{g}}'}$ est le degré d'ionisation. La dissociation de l'eau est

décrite par

$$K_{\text{w}} = c_{\text{H}^+} c_{\text{OH}^-} \Rightarrow \ln K_{\text{w}} = \ln c_{\text{H}^+} + \ln c_{\text{OH}^-}$$

Eq 8.2

La condition d'électroneutralité de la solution en présence d'une base forte et/ou d'un acide fort comme du NaOH ou du HCl est donnée par

$$\sum_i z_i c_i = c_{\text{Na}^+} + \alpha c_{\text{g}}' + c_{\text{H}^+} - c_{\text{Cl}^-} - c_{\text{OH}^-} = 0$$

Eq 8.3

Sachant que c_{Na^+} et c_{Cl^-} sont invariants et en utilisant la relation

$$dpX = -d \log_{10}(X) = -\log_{10}(e) d \ln X = -\log_{10}(e) \frac{dX}{X}$$

Eq 8.4

on obtient par différentiation de Eq 8.1, Eq 8.2 et Eq 8.3:

$$dpK_{ap} = dpH + \log_{10}(e) \left(\frac{d\alpha}{1-\alpha} + \frac{d\alpha}{\alpha} \right) = dpH + \log_{10}(e) \frac{d\alpha}{\alpha(1-\alpha)}$$

Eq 8.5

$$dpK_w = dpH + dpOH$$

Eq 8.6

$$c_g^t d\alpha + dc_{H^+} - dc_{OH^-} = 0$$

Eq 8.7

En utilisant Eq 8.4 dans Eq 8.7, on obtient

$$d\alpha = \frac{dc_{OH^-} - dc_{H^+}}{c_g^t} = \frac{c_{OH^-} d \ln c_{OH^-} - c_{H^+} d \ln c_{H^+}}{c_g^t} = \ln 10 \left(\frac{c_{H^+} dpH - c_{OH^-} dpOH}{c_g^t} \right)$$

Eq 8.8

En utilisant Eq 8.6 et Eq 8.8 dans Eq 8.5, on obtient finalement

$$dpK_{ap} = dpH + \frac{1}{\alpha(1-\alpha)} \left(\left(\frac{c_{H^+}}{c_g^t} + \frac{c_{OH^-}}{c_g^t} \right) dpH - \frac{c_{OH^-}}{c_g^t} dpK_w \right)$$

Eq 8.9

Eq 8.9 peut être simplifiée:

$$dpK_{ap} \approx dpH$$

Eq 8.10

si $\frac{c_{H^+}}{c_g^t}$ et $\frac{c_{OH^-}}{c_g^t} \ll 1$ et α n'est pas trop près de 0 ou 1.

RÉFÉRENCES

- Chitin Coumpounds (1936). Chitin compounds. GB 458839, (E. I. du Pont de Nemours & Co.).
- Aiba, S. (1986). "Studies on chitosan: 1. Determination of the degree of N-acetylation of chitosan by ultraviolet spectrophotometry and gel permeation chromatography." International Journal of Biological Macromolecules 8(3): 173-6.
- Aiba, S. (1991). "Studies on Chitosan .3. Evidence for the Presence of Random and Block Copolymer Structures in Partially N-Acetylated Chitosans." International Journal of Biological Macromolecules 13(1): 40-44.
- Aiba, S. (1992). "Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans." International Journal of Biological Macromolecules 14(4): 225-8.
- Alexandrowicz, Z. and A. Katchalsky (1963). "Colligative properties of polyelectrolyte solutions in excess of salt." Journal of Polymer Science, Part A: General Papers 1(10): 3231-60.
- Allan, G. G. and M. Peyron (1995). "Molecular weight manipulation of chitosan I: kinetics of depolymerization by nitrous acid." Carbohydrate Research 277: 257-272.
- Allan, G. G. and M. Peyron (1995). "Molecular weight manipulation of chitosan II: prediction and control of extent of depolymerization by nitrous acid." Carbohydrate Research 277: 273-282.
- Amano, K. and E. Ito (1978). "The action of lysozyme on partially deacetylated chitin." Eur J Biochem FIELD Full Journal Title:European journal of biochemistry / FEBS 85(1): 97-104.
- Amiji, M. M. (1995). "Pyrene Fluorescence Study of Chitosan Self-Association in Aqueous-Solution." Carbohydrate Polymers 26(3): 211-213.
- Anthonsen, M. and O. Smidsrod (1995). "Hydrogen ion titration of chitosans with varying degrees of N-acetylation by monitoring induced 1H-NMR chemical shifts." Carbohydrate Polymer 26(4): 303-305.

- Anthonsen, M. W., K. M. Varum, et al. (1994). "Aggregates in Acidic Solutions of Chitosans Detected by Static Laser-Light Scattering." Carbohydrate Polymers 25(1): 13-23.
- Anthonsen, M. W., K. M. Varum, et al. (1993). "Solution Properties of Chitosans - Conformation and Chain Stiffness of Chitosans with Different Degrees of N-Acetylation." Carbohydrate Polymers 22(3): 193-201.
- Anthonsen, M. W., K. M. Varum, et al. (1993). "Solution properties of chitosans: conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of N-acetylation." Carbohydrate Polymers 22(3): 193-201.
- Aral, C. and J. Akbuga (2003). "Preparation and in vitro transfection efficiency of chitosan microspheres containing plasmid DNA: poly(L-lysine) complexes." Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 6(3): 321-326.
- Balazs, N. and P. Sipos (2007). "Limitations of pH-potentiometric titration for the determination of the degree of deacetylation of chitosan." Carbohydrate Research 342(1): 124-130.
- Baxter, A., M. Dillon, et al. (1992). "Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan." Int J Biol Macromol FIELD Full Journal Title:International journal of biological macromolecules 14(3): 166-9.
- Behr, J. P. (1997). "The proton sponge: A trick to enter cells the viruses did not exploit." Chimia 51(1-2): 34-36.
- Berth, G., H. Dautzenberg, et al. (1998). "Physicochemical characterization of chitosans varying in degree of acetylation." Carbohydrate Polymers 36(2/3): 205-216.
- Bieber, T., W. Meissner, et al. (2002). "Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes." Journal of Controlled Release 82(2-3): 441-454.
- Borchard, G. (2001). "Chitosans for gene delivery." Advanced Drug Delivery Reviews 52(2): 145-150.
- Borukhov, I., D. Andelman, et al. (2000). "Polyelectrolyte titration: theory and experiment." Journal of Physical Chemistry B 104(47): 11027-11034.

- Boussif, O., F. Lezoualch, et al. (1995). "A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in-Vivo - Polyethylenimine." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92(16): 7297-7301.
- Bozkir, A. and O. M. Saka (2004). "Chitosan-DNA nanoparticles: effect on DNA integrity, bacterial transformation and transfection efficiency." Journal of Drug Targeting 12(5): 281-288.
- Bozkir, A. and O. M. Saka (2004). "Chitosan nanoparticles for plasmid DNA delivery: effect of chitosan molecular structure on formulation and release characteristics." Drug delivery 11(2): 107-112.
- Broussignac, P. (1968). "Chitosan: a natural polymer not well known by the industry." Chimie & Industrie, Genie Chimique 99(9): 1241-7.
- Brugnerotto, J., J. Desbrieres, et al. (2001). "Overview on structural characterization of chitosan molecules in relation with their behavior in solution." Macromolecular Symposia 168: 1-20.
- Brugnerotto, J., J. Desbrieres, et al. (2001). "Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography." Polymer 42(25): 09921-09927.
- Brunner, S., T. Sauer, et al. (2000). "Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex polyplex and recombinant adenovirus." Gene Therapy 7(5): 401-407.
- Buschmann, M. D. and A. J. Grodzinsky (1995). "A molecular model of proteoglycan-associated electrostatic forces in cartilage mechanics." J Biomech Eng FIELD Full Journal Title:Journal of biomechanical engineering 117(2): 179-92.
- Carnie, S. L. and G. M. Torrie (1984). "The statistical mechanics of the electrical double layer." Advances in Chemical Physics 56: 141-253.
- Chang, S. W., J. Y. Westcott, et al. (1987). "Pulmonary vascular injury by polycations in perfused rat lungs." Journal of Applied Physiology 62(5): 1932-1943.
- Cheng, C. Y. and Y. K. Li (2000). "An Aspergillus chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides." Biotechnology and Applied Biochemistry 32: 197-203.

- Chenite, A., M. Buschmann, et al. (2001). "Rheological characterization of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions." Carbohydrate Polymers 46(1): 39-47.
- Chenite, A., C. Chaput, et al. (2000). "Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ." Biomaterials 21(21): 2155-61.
- Chevrier, A., C. D. Hoemann, et al. (2007). "Chitosan-glycerol phosphate/blood implants increase cell recruitment, transient vascularization and subchondral bone remodeling in drilled cartilage defects." Osteoarthritis and Cartilage 15(3): 316-327.
- Chew, J. L., C. B. Wolfowicz, et al. (2003). "Chitosan nanoparticles containing plasmid DNA encoding house dust mite allergen, Der p 1 for oral vaccination in mice." Vaccine 21(21-22): 2720-2729.
- Cho, J., M.-C. Heuzey, et al. (2005). "Physical Gelation of Chitosan in the Presence of b-Glycerophosphate: The Effect of Temperature." Biomacromolecules 6(6): 3267-3275.
- Cho, J., M. C. Heuzey, et al. (2006). "Effect of urea on solution behavior and heat-induced gelation of chitosan-beta-glycerophosphate." Carbohydrate Polymers 63(4): 507-518.
- Cho, Y. W., J. Jang, et al. (2000). "Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins." Biomacromolecules 1(4): 609-614.
- Chou, T. C., E. Fu, et al. (2003). "Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation." Biochem Biophys Res Commun 302(3): 480-3.
- Cleland, R. L., J. L. Wang, et al. (1982). "Polyelectrolyte properties of sodium hyaluronate. 2. Potentiometric titration of hyaluronic acid." Macromolecules 15(2): 386-95.
- Corsi, K., F. Chellat, et al. (2003). "Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles." Biomaterials 24(7): 1255-1264.
- Cravotto, G., S. Tagliapietra, et al. (2005). "Chemical modification of chitosan under high-intensity ultrasound." Ultrasonics Sonochemistry 12(1-2): 95-98.

- Cui, Z. and R. J. Mumper (2001). "Chitosan-based nanoparticles for topical genetic immunization." Journal of Controlled Release 75(3): 409-419.
- Dang, J. M. and K. W. Leong (2006). "Natural polymers for gene delivery and tissue engineering." Advanced Drug Delivery Reviews 58(4): 487-499.
- Danielsen, S., K. M. Varum, et al. (2004). "Structural analysis of chitosan mediated DNA condensation by AFM: influence of chitosan molecular parameters." Biomacromolecules 5(3): 928-936.
- Danion, A. (Travaux en cours).
- Delben, F., R. Lapasin, et al. (1990). "Flow Properties of N-(Carboxymethyl) Chitosan Aqueous Systems in the Sol and Gel Domains." International Journal of Biological Macromolecules 12(1): 9-13.
- Deryagin, B. and L. Landau (1941). "Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes." Acta Physicochimica URSS 14: 633-62.
- Desbrieres, J., C. Martinez, et al. (1996). "Hydrophobic derivatives of chitosan: Characterization and rheological behaviour." International Journal of Biological Macromolecules 19(1): 21-28.
- Domard, A. (1987). "Determination of N-acetyl content in chitosan samples by CD measurements." International Journal of Biological Macromolecules 9(6): 333-6.
- Domard, A. (1987). "pH and CD measurements on a fully deacetylated chitosan: application to copper(II)-polymer interactions." International Journal of Biological Macromolecules 9(2): 98-104.
- Domard, A. and M. Rinaudo (1983). "Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan." International Journal of Biological Macromolecules 5(1): 49-52.
- Domszy, J. G. and G. A. F. Roberts (1985). "Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analyzing chitosan." Makromolekulare Chemie 186(8): 1671-7.
- Draget, K. I. (1996). "Associating phenomena in highly acetylated chitosan gels." Polymer Gels and Networks 4(2): 143-151.

- Duarte, M. L., M. C. Ferreira, et al. (2001). "Determination of the degree of acetylation of chitin materials by ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy." International Journal of Biological Macromolecules 28(5): 359-363.
- Ekrami, H. M. and W. C. Shen (1995). "Carbamylation decreases the cytotoxicity but not the drug-carrier properties of polylysines." Journal of Drug Targeting 2(6): 469-475.
- Erbacher, P., S. Zou, et al. (1998). "Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability." Pharmaceutical Research 15(9): 1332-1339.
- Escriou, V., M. Carriere, et al. (2003). "NLS bioconjugates for targeting therapeutic genes to the nucleus." Advanced Drug Delivery Reviews 55(2): 295-306.
- Evans, D. F. (1998). The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry, Biology, and Technology Meet, 2nd.
- Ferber, D. (2001). "Gene therapy: Safer and virus-free?" Science 294(5547): 1638-1642.
- Filion, D. (2005). "Mécanisme de gélification par augmentation de la température du mélange chitosane/glycérol-phosphate " Thèse de doctorat (Ecole polytechnique de Montréal)
214 p.
- Filion, D., M. Lavertu, et al. (2006). "GEL FORMATION OF POLYELECTROLYTE AQUEOUS SOLUTIONS BY THERMALLY INDUCED CHANGES IN IONIZATION STATE." Brevet soumis.
- Filion, D., M. Lavertu, et al. (2007). Ionization and Solubility of Chitosan Solutions Related to Thermosensitive Chitosan/Glycerol-Phosphate Systems. Biomacromolecules (in press).
- Fixman, M. (1979). "The Poisson-Boltzmann equation and its application to polyelectrolytes." Journal of Chemical Physics 70(11): 4995-5005.
- Fukada, H. and K. Takahashi (1998). "Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride." Proteins: Structure, Function, and Genetics 33(2): 159-166.

- Gori, S. (2002). Gelification et degradation d'un biopolymere par voie enzymatique. Canada, Ecole Polytechnique, Montreal (Canada).
- Hay, R. J. (1992). ATCC Quality Control Methods for Cell Lines. Rockville, Maryland, American Type Culture Collection.
- Hirai, A., H. Odani, et al. (1991). "Determination of degree of deacetylation of chitosan by proton NMR spectroscopy." Polymer Bulletin (Berlin, Germany) 26(1): 87-94.
- Hirano, S., Y. Kondo, et al. (1985). "Preparation of acetylated derivatives of modified chito-oligosaccharides by the depolymerisation of partially N-acetylated chitosan with nitrous acid." Carbohydrate Research 144: 338-341.
- Hirano, S., H. Seino, et al. (1990). "Chitosan: a biocompatible material for oral and intravenous administrations." Prog. Biomed. Polym., [Proc. Am. Chem. Soc. Symp.]: 283-90.
- Hoemann, C. D., M. Hurtig, et al. (2005). "Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects." J Bone Joint Surg Am FIELD Full Journal Title:The Journal of bone and joint surgery. American volume 87(12): 2671-86.
- Hoppe-Seyler, F. (1894). "Chitin and cellulose." Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft 27: 3329-31.
- Howard, M. B., N. A. Ekborg, et al. (2003). "Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 30(11): 627-635.
- Huang, D. M. and D. Chandler (2000). "Temperature and length scale dependence of hydrophobic effects and their possible implications for protein folding." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(15): 8324-8327.
- Huang, M., C. W. Fong, et al. (2005). "Transfection efficiency of chitosan vectors: effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation." Journal of Controlled Release 106(3): 391-406.

- Huang, M., E. Khor, et al. (2004). "Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation." Pharmaceutical Research 21(2): 344-353.
- Huang, M., Z. Ma, et al. (2002). "Uptake of FITC-chitosan nanoparticles by A549 cells." Pharmaceutical Research 19: 1488-1494.
- Iqbal, M., W. Lin, et al. (2003). "Nasal delivery of chitosan-DNA plasmid expressing epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) induces protective CTL responses in BALB/c mice." Vaccine 21(13-14): 1478-1485.
- Ishii, T., Y. Okahata, et al. (2001). "Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes." Biochimica et Biophysica Acta 1514(1): 51-64.
- Iversen, C., A. L. Kjoniksen, et al. (1997). "Linear and nonlinear rheological responses in aqueous systems of hydrophobically modified chitosan and its unmodified analogue." Polymer Bulletin 39(6): 747-754.
- Janes, K. A. and M. J. Alonso (2003). "Depolymerized chitosan nanoparticles for protein delivery: Preparation and characterization." Journal of Applied Polymer Science 88(12): 2769-2776.
- Jarry, C., C. Chaput, et al. (2001). "Effects of steam sterilization on thermogelling chitosan-based gels." Journal of Biomedical Materials Research 58(1): 127-135.
- Kai, E. and T. Ochiya (2004). "A method for oral DNA delivery with N-acetylated chitosan." Pharmaceutical Research 21(5): 838-843.
- Katchalsky, A., N. Shavit, et al. (1954). "Dissociation of weak polymeric acids and bases." Journal of Polymer Science 13: 69-84.
- Kato, Y., H. Onishi, et al. (2002). "Depolymerization of N-succinyl-chitosan by hydrochloric acid." Carbohydrate Research 337(6): 561-564.
- Kiang, T., J. Wen, et al. (2004). "The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection." Biomaterials 25(22): 5293-5301.
- Kim, T. H., I. K. Park, et al. (2004). "Galactosylated chitosan/DNA nanoparticles prepared using water-soluble chitosan as a gene carrier." Biomaterials 25(17): 3783-3792.

- Kittur, F. S., A. B. V. Kumar, et al. (2003). "Chitosan analysis by a pectinase isozyme of *Aspergillus niger* - A non-specific activity." Carbohydrate Polymers 53(2): 191-196.
- Knapczyk, J., L. Krowczynski, et al. (1984). Pharmaceutical dosage forms with chitosan. Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. G. Skjak-Braek, T. Anthonsen and P. Sandford. London, Elsevier Applied Science: 665-669.
- Koping-Hoggard, M., Y. S. Mel'nikova, et al. (2003). "Relationship between the physical shape and the efficiency of oligomeric chitosan as a gene delivery system in vitro and in vivo." Journal of Gene Medicine 5(2): 130-141.
- Koping-Hoggard, M., I. Tubulekas, et al. (2001). "Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo." Gene Therapy 8(14): 1108-1121.
- Koping-Hoggard, M., K. M. Varum, et al. (2004). "Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers." Gene Therapy 11(19): 1441-1452.
- Kotin, L. and M. Nagasawa (1962). "Chain model for polyelectrolytes. VII. Potentiometric titration and ion binding in solutions of linear polyelectrolytes." Journal of Chemical Physics 36: 873-9.
- Kumar, M., X. Kong, et al. (2003). "Chitosan IFN-gamma-pDNA Nanoparticle (CIN) Therapy for Allergic Asthma." Genetic Vaccines and Therapy 1: 3.
- Kurita, K., T. Sannan, et al. (1977). "Studies on chitin, 4. Evidence for formation of block and random copolymers of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine by hetero- and homogeneous hydrolyses." Makromolekulare Chemie 178(12): 3197-202.
- Lavertu, M., S. Methot, et al. (2006). "High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation." Biomaterials 27(27): 4815-4824.

- Lavertu, M., Z. Xia, et al. (2003). "A validated ^1H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 32(6): 1149-1158.
- Lee, K. Y., I. C. Kwon, et al. (1998). "Preparation of chitosan self-aggregates as a gene delivery system." Journal of Controlled Release 51(2-3): 213-220.
- Lee, M., J. W. Nah, et al. (2001). "Water-soluble and low molecular weight chitosan-based plasmid DNA delivery." Pharmaceutical Research 18(4): 427-431.
- Leong, K. W., H. Q. Mao, et al. (1998). "DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles." Journal of Controlled Release 53(1-3): 183-193.
- Li, J., Y. M. Du, et al. (2007). "Influence of molecular parameters on the degradation of chitosan by a commercial enzyme." Polymer Degradation and Stability 92(3): 515-524.
- Li, X. W., D. K. Lee, et al. (2003). "Sustained expression in mammalian cells with DNA complexed with chitosan nanoparticles." Biochimica et Biophysica Acta 1630(1): 7-18.
- Liu, W. G. and K. De Yao (2002). "Chitosan and its derivatives - a promising non-viral vector for gene transfection." Journal of Controlled Release 83(1): 1-11.
- Liu, W. G. and K. D. Yao (2002). "Chitosan and its derivatives—a promising non-viral vector for gene transfection." Journal of Controlled Release 83(1): 1-11.
- Lum, K., D. Chandler, et al. (1999). "Hydrophobicity at small and large length scales." Journal of Physical Chemistry B 103(22): 4570-4577.
- Ma, P. L. (Thèse en cours).
- MacLaughlin, F. C., R. J. Mumper, et al. (1998). "Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery." J Control Release 56(1-3): 259-72.
- Malette, W. G., H. J. Quigley, et al. (1983). "Chitosan: a new hemostatic." Annals of Thoracic Surgery 36(1): 55-58.

- Mandel, M. (1992). "The Poisson-Boltzmann equation for aqueous solutions of strong polyelectrolytes without added salt: the cell model revisited." Journal of Physical Chemistry 96(10): 3934-42.
- Mao, H. Q., K. Roy, et al. (2001). "Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency." Journal of Controlled Release 70(3): 399-421.
- Mao, S., X. Shuai, et al. (2004). "The depolymerization of chitosan: effects on physicochemical and biological properties." International Journal of Pharmaceutics 28(1-2): 45-54.
- Marcus, R. A. (1955). "Calculation of thermodynamic properties of polyelectrolytes." Journal of Chemical Physics 23: 1057-68.
- Mazeau, K., W. T. Winter, et al. (1994). "Molecular and crystal structure of a high-temperature polymorph of chitosan from electron diffraction data." Macromolecules 27(26): 7606-12.
- Miya, M., R. Iwamoto, et al. (1980). "IR spectroscopic determination of amide (CONH) content in highly deacylated chitosan." International Journal of Biological Macromolecules 2(5): 323-4.
- Moore, G. K. and G. A. F. Roberts (1980). "Determination of the degree of N-acetylation of chitosan." International Journal of Biological Macromolecules 2(2): 115-16.
- Mumper, R. J. and A. Rolland Composition useful for delivery of nucleic acids or oligo:nucleotide(s) to cells - comprises the nucleic acid or oligo:nucleotide and a chitosan-based compound, GENEMEDICINE INC (GENE-Non-standard) VALENTIS INC (VALE-Non-standard) ROLLAND A (ROLL-Individual) MUMPER R J (MUMP-Individual).
- Muraki, E., F. Yaku, et al. (1993). "Measurement of degree of deacetylation in D-glucosamine oligosaccharides by UV absorption." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 57(11): 1929-30.

- Muzzarelli, R., V. Bicchiera, et al. (1992). "Role of N-Carboxybutyl Chitosan in the Repair of the Meniscus." Journal of Bioactive and Compatible Polymers 7(2): 130-148.
- Muzzarelli, R. A. (1997). "Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives." Cell Mol Life Sci 53(2): 131-40.
- Muzzarelli, R. A. A., M. Mattioli-Belmonte, et al. (1999). "Biochemistry, histology and clinical uses of chitins and chitosans in wound healing." Exs 87(Chitin and Chitinases): 251-264.
- Neves, C., D. Scherman, et al. (2001). Coupling of Nuclear Localization Signals to Plasmid DNA. Nonviral vectors for gene therapy : methods and protocols. M. A. Findeis. Totowa, N.J., Humana Press: 105-110.
- Niola, F., N. Basora, et al. (1993). "A rapid method for the determination of the degree of N-acetylation of chitin-chitosan samples by acid hydrolysis and HPLC." Carbohydrate Research 238: 1-9.
- Nishio, T. (1994). "Monte Carlo simulations on potentiometric titration of cylindrical polyelectrolytes: introduction of a method and its application to model systems without added salt." Biophysical Chemistry 49(3): 201-14.
- Nitta, K. and S. Sugai (1974). "Polymer concentration dependence of surface electric potential of cylindrical polyelectrolyte in aqueous salt solutions." Journal of Physical Chemistry 78(12): 1189-93.
- No, H. K., J. W. Nah, et al. (2003). "Effect of time/temperature treatment parameters on depolymerization of chitosan." Journal of Applied Polymer Science 87: 1890-1894.
- Nordtveit, R. J., K. M. Varum, et al. (1994). "Degradation of fully water-soluble, partially N-acetylated chitosans with lysozyme." Carbohydrate Polymers 23(4): 253-260.
- Nordtveit, R. J., K. M. Varum, et al. (1996). "Degradation of partially N-acetylated chitosans with hen egg white and human lysozyme." Carbohydrate Polymers 29(2): 163-167.
-

- Nystrom, B., A. L. Kjoniksen, et al. (1999). "Characterization of association phenomena in aqueous systems of chitosan of different hydrophobicity." Advances in Colloid and Interface Science 79(2-3): 81-103.
- Okamoto, Y., K. Shibasaki, et al. (1995). "Evaluation of chitin and chitosan on open wound healing in dogs." J Vet Med Sci 57(5): 851-4.
- Okuyama, K., K. Noguchi, et al. (1997). "Molecular and Crystal Structure of Hydrated Chitosan." Macromolecules 30(19): 5849-5855.
- Onishi, H. and Y. Machida (1999). "Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice." Biomaterials 20(2): 175-82.
- Otterlei, M., K. M. Varum, et al. (1994). "Characterization of Binding and Tnf-Alpha-Inducing Ability of Chitosans on Monocytes - the Involvement of Cd14." Vaccine 12(9): 825-832.
- Ottoy, M. H., K. M. Varum, et al. (1996). "Preparative and analytical size-exclusion chromatography of chitosans." Carbohydrate Polymers 31(4): 253-261.
- Ottoy, M. H., K. M. Varum, et al. (1996). "Compositional heterogeneity of heterogeneously deacetylated chitosans." Carbohydrate Polymers 29(1): 17-24.
- Park, I. K., T. H. Kim, et al. (2003). "Visualization of transfection of hepatocytes by galactosylated chitosan-graft-poly(ethylene glycol)/DNA complexes by confocal laser scanning microscopy." International Journal of Pharmaceutics 257(1-2): 103-110.
- Park, J. W., K. H. Choi, et al. (1983). "Acid-base equilibriums and related properties of chitosan." Bulletin of the Korean Chemical Society 4(2): 68-72.
- Park, Y. J., Y. M. Lee, et al. (2000). "Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration." Biomaterials 21(2): 153-159.
- Philippova, O. E., E. V. Volkov, et al. (2001). "Two types of hydrophobic aggregates in aqueous solutions of chitosan and its hydrophobic derivative." Biomacromolecules 2(2): 483-490.
- Pouton, C. W. (1998). "Nuclear import of polypeptides, polynucleotides and supramolecular complexes." Advanced Drug Delivery Reviews 34(1): 51-64.

- Pouton, C. W. and L. W. Seymour (2001). "Key issues in non-viral gene delivery." Advanced Drug Delivery Reviews 46(1-3): 187-203.
- Prochazkova, S., K. M. Varum, et al. (1999). "Quantitative determination of chitosans by ninhydrin." Carbohydrate Polymers 38(2): 115-122.
- Rao, S. B. and C. P. Sharma (1997). "Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential." Journal of Biomedical Materials Research 34(1): 21-28.
- Ratner, B. D. and S. J. Bryant (2004). "Biomaterials: Where we have been and where we are going." Annual Review of Biomedical Engineering 6: 41-75.
- Raymond, L., F. G. Morin, et al. (1993). "Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR." Carbohydrate Research 246: 331-6.
- Rege, P. R. and L. H. Block (1999). "Chitosan processing: influence of process parameters during acidic and alkaline hydrolysis and effect of the processing sequence on the resultant chitosan's properties." Carbohydrate Research 321(3-4): 235-245.
- Richardson, S. C., H. V. Kolbe, et al. (1999). "Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA." International Journal of Pharmaceutics 178(2): 231-243.
- Rigby, G. W. (1936). Deacetylated chitin and salts of same. US, (E. I. du Pont de Nemours & Co.).
- Rinaudo, M. (2006). "Chitin and chitosan: Properties and applications." Progress in Polymer Science 31(7): 603-632.
- Rinaudo, M., M. Milas, et al. (1993). "Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion." International Journal of Biological Macromolecules 15(5): 281-5.
- Rinaudo, M., G. Pavlov, et al. (1999). "Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan." Polymer 40(25): 7029-7032.
-

- Rinaudo, M., G. Pavlov, et al. (1999). "Solubilization of chitosan in strong acid medium." International Journal of Polymer Analysis and Characterization 5(3): 267-276.
- Roberts, G. A. F. (1992). Chitin Chemistry : Biomimetic materials chemistry. London, Macmillan.
- Robinson, R. A. and R. H. Stokes (2002). Electrolyte Solutions. 2nd Revised edition.
- Romoren, K., S. Pedersen, et al. (2003). "The influence of formulation variables on in vitro transfection efficiency and physicochemical properties of chitosan-based polyplexes." International Journal of Pharmaceutics 261(1-2): 115-127.
- Roy, I., S. Mitra, et al. (2003). "Calcium phosphate nanoparticles as novel non-viral vectors for targeted gene delivery." International Journal of Pharmaceutics 250(1): 25-33.
- Roy, K. (1999). Chitosan-DNA nanoparticles: synthesis, characterization, subcellular transport and oral delivery of genetic vaccines. Baltimore, Maryland, Johns Hopkins University: 220.
- Roy, K., H.-Q. Mao, et al. (1999). "Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunological protection in a murine model of peanut allergy." Nature Medicine (New York) 5(4): 387-391.
- Sabnis, S. and L. H. Block (1997). "Improved infrared spectroscopic method for the analysis of degree of N-deacetylation of chitosan." Polymer Bulletin (Berlin) 39(1): 67-71.
- Sabnis, S. and L. H. Block (2000). "Chitosan as an enabling excipient for drug delivery systems I. Molecular modifications." International Journal of Biological Macromolecules 27: 181-186.
- Sall, K. N., J. K. Kreter, et al. (1987). "The effect of chitosan on corneal wound healing." Ann Ophthalmol 19(1): 31-3.
- Salmon, S. and S. M. Hudson (1997). "Crystal morphology, biosynthesis, and physical assembly of cellulose, chitin, and chitosan." Journal of Macromolecular Science-Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics C37(2): 199-276.

- Sannan, T., K. Kurita, et al. (1975). "Chitin. 1. Solubility change by alkaline treatment and film casting." Makromolekulare Chemie 176(4): 1191-5.
- Sannan, T., K. Kurita, et al. (1976). "Studies on chitin, 2. Effect of deacetylation on solubility." Macromolecular Chemistry 177: 3589-3600.
- Sannan, T., K. Kurita, et al. (1978). "Studies on chitin. 7. Infrared spectroscopic determination of degree of deacetylation." Polymer 19(4): 458-9.
- Sashiwa, H., H. Saimoto, et al. (1991). "Distribution of the Acetamide Group in Partially Deacetylated Chitins." Carbohydrate Polymers 16(3): 291-296.
- Sashiwa, H., H. Saimoto, et al. (1993). "N-Acetyl Group Distribution in Partially Deacetylated Chitins Prepared under Homogeneous Conditions." Carbohydrate Research 242: 167-172.
- Sato, T., T. Ishii, et al. (2001). "In vitro gene delivery mediated by chitosan. effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency." Biomaterials 22(15): 2075-2080.
- Schatz, C., C. Viton, et al. (2003). "Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution." Biomacromolecules 4(3): 641-648.
- Shigemasa, Y., H. Matsuura, et al. (1996). "Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin." Int J Biol Macromol FIELD Full Journal Title:International journal of biological macromolecules 18(3): 237-42.
- Shigemasa, Y. and S. Minami (1996). Application of chitin and chitosan for biomaterials. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, Vol 13. 13: 383-420.
- Shir, A., M. Ogris, et al. (2006). "EGF receptor-targeted synthetic double-stranded RNA eliminates glioblastoma, breast cancer, and adenocarcinoma tumors in mice." Plos Medicine 3(1): 125-135.
- Smits, R. G., G. J. M. Koper, et al. (1993). "The influence of nearest- and next-nearest-neighbor interactions on the potentiometric titration of linear poly(ethylenimine)." Journal of Physical Chemistry 97(21): 5745-51.

- Somia, N. and I. M. Verma (2000). "Gene therapy: Trials and tribulations." Nature Reviews Genetics 1(2): 91-99.
- Sorlier, P., A. Denuziere, et al. (2001). "Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan." Biomacromolecules 2(3): 765-772.
- Strand, S. P., S. Danielsen, et al. (2005). "Influence of chitosan structure on the formation and stability of DNA-chitosan polyelectrolyte complexes." Biomacromolecules 6(6): 3357-3366.
- Strand, S. P., K. Tommeraas, et al. (2001). "Electrophoretic light scattering studies of chitosans with different degrees of N-acetylation." Biomacromolecules 2(4): 1310-1314.
- Tan, S. C., E. Khor, et al. (1998). "The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination." Talanta 45(4): 713-719.
- Tang, E. S. K., M. Huang, et al. (2003). "Ultrasonication of chitosan and chitosan nanoparticles." International Journal of Pharmaceutics 265(1-2): 103-114.
- Terayama, H. (1952). "Method of colloid titration (a new titration between polymer ions)." Journal of Polymer Science 8: 243-53.
- Thanou, M., B. I. Florea, et al. (2002). "Quaternized chitosan oligomers as novel gene delivery vectors in epithelial cell lines." Biomaterials 23(1): 153-159.
- Thomas, M. and A. M. Klibanov (2003). "Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery." Applied Microbiology and Biotechnology 62(1): 27-34.
- Tomihata, K. and Y. Ikada (1997). "In vitro and in vivo degradation of films of chitins and its deacetylated derivatives." Biomaterials 18: 567-575.
- Tommeraas, K., K. M. Varum, et al. (2001). "Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans." Carbohydrate Research 333(2): 137-144.

- Tsao, Y. H., D. F. Evans, et al. (1993). "Long-Range Attraction between a Hydrophobic Surface and a Polar Surface Is Stronger Than That between 2 Hydrophobic Surfaces." Langmuir 9(3): 779-785.
- Tsukada, S. and Y. Inoue (1981). "Conformational properties of chitooligosaccharides: titration, optical rotation, and carbon-13 NMR studies of chitooligosaccharides." Carbohydrate Research 88(1): 19-38.
- Ueno, H., H. Yamada, et al. (1999). "Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs." Biomaterials FIELD Full Journal Title:Biomaterials 20(15): 1407-14.
- Ullner, M. (2002). Polyelectrolytes Models in Theory and Simulation. Handbook of Polyelectrolytes and Their Applications, Volume 3: Applications of Polyelectrolytes and Theoretical Models. S. K. Tripathy, J. Kumar and H. S. Nalwa: 271-308.
- Ullner, M., B. Joensson, et al. (1996). "A Monte Carlo study of titrating polyelectrolytes." Journal of Chemical Physics 104(8): 3048-57.
- Varum, K. M., M. W. Anthonsen, et al. (1991). "Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field n.m.r. spectroscopy." Carbohydr Res FIELD Full Journal Title:Carbohydrate research 211(1): 17-23.
- Varum, K. M., M. W. Anthonsen, et al. (1991). "High-Field Nmr-Spectroscopy of Partially N-Deacetylated Chitins (Chitosans) .1. Determination of the Degree of N-Acetylation and the Distribution of N-Acetyl Groups in Partially N-Deacetylated Chitins (Chitosans) by High-Field Nmr-Spectroscopy." Carbohydrate Research 211(1): 17-23.
- Varum, K. M., M. W. Anthonsen, et al. (1991). "High-Field Nmr-Spectroscopy of Partially N-Deacetylated Chitins (Chitosans) .3. C-13-Nmr Studies of the Aceylation Sequences in Partially N-Deacetylated Chitins (Chitosans)." Carbohydrate Research 217: 19-27.

- Varum, K. M., H. K. Holme, et al. (1996). "Determination of enzymatic hydrolysis specificity of partially N-acetylated chitosans." Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects 1291(1): 5-15.
- Varum, K. M., M. M. Myhr, et al. (1997). "In vitro degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum." Carbohydrate Research 299(1-2): 99-101.
- Varum, K. M., M. H. Ottoy, et al. (1994). "Water-solubility of partially N-acetylated chitosans as a function of pH: effect of chemical composition and depolymerization." Carbohydrate Polymers 25(2): 65-70.
- Verwey, E. J. W. and J. T. G. Overbeek (1948). Theory of the Stability of Lyophobic Colloids.
- Vila, A., A. Sanchez, et al. (2004). "Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 57(1): 123-131.
- Xu, W., Y. Shen, et al. (2004). "Intranasal delivery of chitosan-DNA vaccine generates mucosal SIgA and anti-CVB3 protection." Vaccine 22(27-28): 3603-3612.
- Yamamoto, H. and M. Amaike (1997). "Biodegradation of cross-linked chitosan gels by a microorganism." Macromolecules 30(13): 3936-3937.
- Zhang, H. and S. H. Neau (2001). "In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation." Biomaterials 22: 1653-1658.
- Zhong, B., G. Y. Wu, et al. (2001). Progress Toward a Synthetic Virus: A Multicomponent System for Liver-Directed DNA Delivery. Nonviral vectors for gene therapy : methods and protocols. M. A. Findeis. Totowa, N.J., Humana Press: 111-122.