Structures poreuses tridimensionnelles de biopolymères pour l'ingénierie tissulaire

Julien Ramier

▶ **To cite this version:**

Julien Ramier. Structures poreuses tridimensionnelles de biopolymères pour l'ingénierie tissulaire. Autre. Université Paris-Est, 2012. Français. NNT : 2012PEST1159 . tel-00805370

HAL Id: tel-00805370

https://theses.hal.science/tel-00805370

Submitted on 27 Mar 2013

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

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

UNIVERSITE PARIS-EST

Ecole doctorale « Sciences, Ingénierie et Environnement »

THESE DE DOCTORAT
Spécialité : chimie et science des matériaux

présentée par

Julien RAMIER

Structures fibreuses tridimensionnelles de biopolymères pour l'ingénierie tissulaire

Soutenue le 29 novembre 2012 devant le jury composé de :

M. Jean Coudane, Professeur, Université Montpellier 1	*Rapporteur*
M. Jean-Luc Six, Professeur, Université de Lorraine	*Rapporteur*
M. Iliya Rashkov, Professeur, Académie Bulgare des Sciences	*Examinateur*
Mme. Patricia Albanese, Maître de Conférences, Université Paris-Est	*Examinateur*
Mme. Estelle Renard, Professeur, Université Paris-Est	*Directeur de thèse*
M. Daniel Grande, Chargé de Recherche au CNRS	*Directeur de thèse*

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord l'ensemble des membres de l'équipe « Systèmes Polymères Complexes » de l'ICMPE pour leur gentillesse et leur disponibilité tout au long de ma thèse. Cet environnement de travail tout à fait agréable avec des discussions toujours animées lors des différents pots, collations ou autre pause-café a vraiment contribué au bon déroulement de ces trois années riches en émotions. Je souhaiterais remercier le Professeur Valérie LANGLOIS pour m'avoir accueilli au sein de ce laboratoire et d'avoir gardé en toutes circonstances un oeil critique et bienveillant sur mes travaux.

Je désire exprimer ma sincère reconnaissance à Monsieur Jean COUDANE et Monsieur Jean-Luc SIX pour avoir accepté de juger ce travail ainsi que Monsieur Iliya RASHKOV et Madame Patricia ALBANESE pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

J'exprime également ma profonde reconnaissance au Professeur Estelle RENARD et au Docteur Daniel GRANDE pour leur enthousiasme, leur patience à mon égard ainsi que pour leur encadrement, leur expertise et leurs encouragements au cours de nos travaux.

Je tiens à témoigner ma gratitude et mon amitié aux Professeurs RASHKOV et MANOLOVA de l'Institute of Polymers de Sofia en Bulgarie pour leurs précieux conseils et leur accueil très chaleureux au sein de leur laboratoire. « Edno golyamo blagodarya » à toute l'équipe des Biogirls et particulièrement à Olya STOILOVA pour leur gentillesse, l'ambiance du laboratoire et leur aide tout au long de mon séjour (« nyama problem » pendant 3 mois !). Je remercie à cet égard l'Ecole doctorale « Sciences, Ingénierie et Environnement » de l'Université Paris-Est pour la bourse de mobilité internationale qui m'a été accordée.

Je souhaite remercier le laboratoire de « Croissance cellulaire, Réparation, et Régénération Tissulaires » (CRRET, UPEC) et particulièrement Thibault BOUDERLIQUE, Fabien CHEVALIER et Dr. Patricia ALBANESE pour leur patience et pour leur temps sacrifié à m'expliquer les mécanismes cellulaires et les techniques pour manipuler correctement les cellules.

Je remercie tous les stagiaires, en particulier Nicolas GENEVAZ et Meyssoun BEN BOUBAKER, pour m'avoir aidé durant ma thèse avec rigueur et bonne humeur. Un grand merci également à Rémy PIRES pour ses analyses EDX et MEB de grande qualité.

Je voudrais remercier Pierre LEMECHKO, Julien BABINOT, David LE STRAT, Davy-Louis VERSACE, Benjamin LE DROUMAGUET, Mohammed GUERROUACHE et Benjamin CARBONNIER pour les franches rigolades et les discussions folkloriques qui ont permis de travailler dans une atmosphère vivifiante.

Enfin, « last but not least », j'aimerais remercier ma Charlotte pour ses encouragements permanents, son soutien sans faille et son courage pour m'avoir supporté durant ces trois dernières années.

LISTE DES ABREVIATIONS

3HB	3-hydroxybutyrate
3HV	3-hydroxyvalérate
3HHx	3-hydroxyhexanoate
3HO	3-hydroxyoctanoate
αMEM	Minimum Essential Medium
ALP	Phosphatase alcaline
ARS	Coloration au rouge d'alizarine
BP	Benzophénone
DCC	Dicyclohexylcarboxydiimide
DMF	Diméthylformamide
DMPA	2,2-diméthoxy-2-phényl acétophénone
DSC	Differential Scanning Calorimetry (Analyse enthalpique différentielle)
EDX	X-ray energy-dispersive analysis (Analyse dispersive en énergie des rayons X)
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
hMSC	Cellule souche mésenchymateuse humaine
GEL	Gélatine
GMA	Méthacrylate de glycidyle
IRTF	Infrarouge à transformée de Fourier
MEB	Microscope Electronique à Balayage
MEC/ECM	Matrice extracellulaire / extracellular matrix
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt
MEB	Microscope Electronique à Balayage
nHA	nanoparticule d'hydroxyapatite
PBS	Phosphate buffered saline
PCL	Poly(ε-caprolactone)
PEG	Poly(éthylène glycol)
PEO	Poly(oxyde d'éthylène)
PHA	Poly(3-hydroxyalcanoate)
PHB	Poly(3-hydroxybutyrate)
PHBHV	Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalérate)
P3HB4HB	Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-4-hydroxybutyrate)
PHO	Poly(3-hydroxyoctanoate)
PHOU	Poly(3-hydroxyoctanoate-*co*-3-hydroxyundécènoate)

PHOep	Poly(3-hydroxyoctanoate) avec des fonctions époxydes en chaîne latérale
PHEMA	Poly(méthacrylate de 2-hydroxyéthyle)
PGMA	Poly(méthacrylate de glycidyle)
PLA	Polylactide
PLCL	Poly(ε-caprolactone-*co*-lactide)
PLGA	Poly(lactide-*co*-glycolide)
PMMA	Poly(méthacrylate de méthyle)
PS	Polystyrène
PVA	Poly(alcool vinylique)
RGD	Séquence peptidique (arginine(ARG);glycine(GLY);acide aspartique(ASP))
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROP	Ring-Opening Polymerization (polymérisation par ouverture de cycles)
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique
TCP	Tissue Cultured Plate (Puits de culture tissulaire)
TFE	Trifluoroéthanol
TGA	Analyse thermogravimétrique
THF	Tétrahydrofurane
UV	Ultraviolet

SOMMAIRE

Introduction générale.....1

Chapitre 1 Etat de l'art sur les matériaux fibreux pour l'ingénierie tissulaire.....5

1.1. Les biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire : définitions et concepts généraux.. 6

1.1.1. Les biomatériaux pour l'ingénierie des tissus osseux.....9

1.1.2. Les principales stratégies d'élaboration de structures poreuses pour l'ingénierie tissulaire.....22

1.2. Le procédé d' « electrospinning » 31

1.2.1. Dispositifs mis en œuvre.....33

1.2.2. Principe de la technique.....35

1.2.3. Paramètres modulables.....37

1.3. Fonctionnalisation des fibres.....41

1.3.1. Introduction de groupements fonctionnels.....42

1.3.2. Association de biomolécules.....44

1.3.3. Co-electrospinning.....49

1.4. Elaboration de fibres à base de polyesters bactériens.....50

1.4.1. Etudes sur le procédé d' « electrospinning » appliqué aux PHAs.....51

1.4.2. Impact biologique d'une matrice à base de PHAs.....53

1.5. Conclusion.....60

1.6. Références Bibliographiques.....62

Chapitre 2 Synthèse de (co)polyesters sous micro-ondes.....77

2.1. Introduction et contexte.....78

2.2. Synthèse de copolymères à blocs à base de PHAs.....81

2.2.1. Etude préliminaire : synthèse sous micro-ondes de copolymères PEG-*b*-PLA.. 82

2.2.2. Synthèse de copolymères PHAs-*b*-PLA 85

2.3. L'apport du chauffage par micro-ondes 97

2.3.1. Production d'oligoesters sous activation par micro-ondes 97

2.3.2. Etude de l'effet « non-thermique » du chauffage par micro-ondes 105

2.4. Références bibliographiques 111

Chapitre 3 Elaboration et fonctionnalisation de matériaux nanofibreux à base de PHAs 113

3.1. Elaboration de fibres d'homopolymères de PHAs 114

3.1.1. Solutions dans le chloroforme 114

3.1.2. Solutions dans un mélange $CHCl_3$/DMF 120

3.1.3. Solutions dans le trifluoroéthanol 123

3.2. Matériaux fibreux à porosité contrôlée 127

3.2.1. Mélange PHA / PEO 127

3.2.2. Mélange PHA / PLA 133

3.3. Fonctionnalisation des matériaux fibreux 140

3.3.1. Incorporation d'hydroxyapatite 141

3.3.2. Incorporation de gélatine 145

3.3.3. Greffage de molécules par addition thiol-ène 146

3.3.4. Fonctionnalisation par introduction de fonctions époxyde 152

3.4. Références bibliographiques 162

Chapitre 4 Investigations Biologiques sur les matrices fibreuses à base de PHAs 163

4.1. Elaboration de matrices biocomposites de PHAs 164

4.2. Différentiation ostéogénique de hMSC sur des matrices biocomposites de PHAs. 187

Conclusion et perspectives 215

INTRODUCTION GENERALE

La volonté de réparer, générer, fabriquer des cellules, des tissus et des organes déficients ou âgés, voire atteindre l'immortalité, a toujours été une partie intégrante de l'ambition humaine. Ce rêve de jouvence est très bien illustré par la mythologie grecque et la légende du titan Prométhée, illustré magnifiquement par Rubens au 17ème siècle, qui donna aux hommes le pouvoir du feu. Il entra ainsi en conflit avec le dieu Zeus qui lui infligea un supplice. Il fut enchaîné à un rocher dans les montagnes du Caucase où un aigle lui rongeait le foie toute la journée. Son supplice était infini car toutes les nuits, son foie se régénérait. Cette légende laisse supposer que les Grecs anciens avaient découvert que le foie est l'un des rares organes humains à se régénérer spontanément en cas de lésion. Ensuite, les religions ont rapporté leurs histoires légendaires notamment avec la guérison miraculeuse du diacre Justinien par Saint Côme et Saint Damien qui réalisèrent la greffe allogénique d'une jambe prélevée sur un cadavre (IIIe siècle après J.C.).
Bien que ces histoires légendaires représentent des notions d'espoir ou de courage, elles reflètent aussi le désir ancestral de l'Homme d'être capable de créer par eux-mêmes des organes fonctionnels.

Cet espoir des cliniciens et scientifiques s'est concrétisé par le développement de la médecine réparatrice et régénérative. La médecine régénératrice vise à reproduire artificiellement les processus biologiques permettant au corps de se reconstituer aux niveaux tissulaire, cellulaire et moléculaire. Il ne s'agit plus, comme dans le cas de la médecine clinique, de conserver l'intégrité du corps mais plutôt de combattre la dégénérescence en elle-même. Ainsi, l'objectif n'est plus la guérison, mais bien la régénération, ce qui en soit ne suppose aucune limite.

Grâce à l'introduction de méthodes d'investigations et d'analyses scientifiques, une nouvelle conception de la Nature est apparue, conduisant à des découvertes biologiques ainsi qu'à la compréhension du fonctionnement de certaines maladies et de certains traumatismes. De nos jours, des matériaux prothétiques et/ou artificiels sont couramment utilisés pour remplacer des tissus ou des membres afin de fournir une restauration partielle des fonctions endommagées. Différents domaines de la chirurgie reconstructrice se sont développés et ont émergé pour améliorer la qualité de vie avec comme concept de base l'idée selon laquelle : un tissu ou organe en remplace un autre. L'évolution ainsi que la modernisation des techniques de

transplantations amènent, aujourd'hui, à trois types de greffes en fonction de l'origine du tissu/organe :

- la greffe autologue où les greffons, essentiellement des cellules ou des tissus, proviennent du patient. Elle mène à de faibles risques immunitaires, cependant la quantité des greffons disponibles est limitée.
- la greffe allogénique où les greffons proviennent d'une source humaine différente. La disponibilité des greffons est acceptable mais le risque élevé de réponse immunitaire entraîne la mise en place de traitements adaptés.
- la greffe xénogénique où le donneur appartient à une espèce différente. La réponse immunitaire est acceptable dans certain cas, cependant, un dépistage efficace doit être mis en place afin d'éviter la transmission de virus animal.

Le nombre de personnes sur liste d'attente d'une greffe dans le monde est en perpétuel augmentation au fil des ans, atteignant aux États-Unis une estimation de 115 000 actuellement.[1] Au sein de l'Union Européenne, les valeurs de 50 000 patients ainsi qu'une moyenne de 12 morts par jour attendant une transplantation ont été rapportées par le Conseil de l'Europe en 2011.[2] Concernant la France, la **Figure 1** illustre la tendance précédemment décrite avec une liste d'attente culminant à 16 371 patients en 2011 mais surtout un nombre des greffes pratiquées en stagnation.[3]

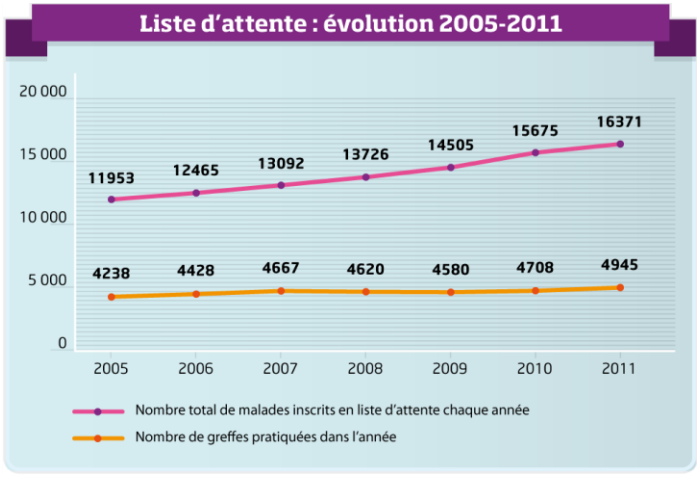


Figure 1 : Evolutions du nombre de malades inscrits sur une liste d'attente pour une greffe et du nombre de greffes pratiquées en France entre 2005 et 2011.

[1] United Network for Organ Sharing. http://www.unos.org (dernière consultation le 21/07/2012).
[2] Conseil de l'Europe. http://www.edqm.eu/fr/Journee-europeene-don-dorganes-1223.html.
[3] Agence de la biomédecine. http://www.dondorganes.fr/016-les-chiffres-cles.

C'est dans ce contexte que l'ingénierie tissulaire a émergé en apportant la capacité de se confronter à la pénurie d'organes générée par le manque de donneurs. Par cette approche multidisciplinaire, de nouveaux tissus fonctionnels sont fabriqués par des cellules qui sont principalement associées à une matrice supportant et guidant le développement tissulaire. Afin de mener à la réussite de ce domaine, divers défis doivent être affrontés tels que les ressources cellulaires, la manipulation des fonctions cellulaires et l'utilisation efficace des cellules souches qui présentent un très fort potentiel. A vrai dire, l'émergence de la biologie des cellules souches a conduit à un nouveau domaine, la médecine régénérative, compte tenu de leur capacité à se différentier et à produire des constructions tissulaires fonctionnelles des organes les plus vitaux.

Notre travail s'inscrit dans la thématique de la reconstruction osseuse. Nous avons cherché à développer de nouvelles structures biomimétiques à base de polymères composites en vue de produire, à plus long terme, des implants biomédicaux attrayants. Ce projet a pour objectif d'élaborer des supports tridimensionnels poreux à base de polyesters biocompatibles et biodégradables par la technique de l'électrofilage (« electrospinning »). Nous avons également cherché à conférer aux supports une biofonctionnalité indispensable dans le cadre d'une application de reconstruction osseuse. Pour ce faire, une biocéramique a été incorporée aux mats non tissés, et parallèlement la fonctionnalisation chimique et biologique covalente des supports a été développée. Le premier verrou technologique de ce travail consiste à contrôler les propriétés physiques des mats non-tissés produits grâce à la maîtrise des paramètres du procédé de fabrication. Un second verrou repose sur la maîtrise de la fonctionnalisation qui devrait permettre d'assurer un environnement favorable à la transmission des signaux cellulaires.

Le premier chapitre de cette thèse est consacré à un état de l'art présentant le concept de l'ingénierie tissulaire, les matériaux et les techniques utilisés pour la fabrication des matrices adaptées à la colonisation des cellules, avec des développements plus précis sur la technique de l' « electrospinning » et la fonctionnalisation des fibres de polymères résultants.

Dans le deuxième chapitre, nous étudions les potentialités et les limites de la synthèse de copolymères à base de poly(3-hydroxyalcanoate)s (PHAs) et de polylactide sous activation par micro-ondes. L'apport des micro-ondes sur la polymérisation du lactide en solution est tout particulièrement discuté. L'utilisation des micro-ondes est également appliquée à la préparation d'oligomères de PHAs par dégradation thermique.

Le troisième chapitre a été effectué en collaboration avec l' « Institute of Polymers de Sofia » en Bulgarie pour l'élaboration de matériaux nanofibreux à base de PHAs par « electrospinning ». Un procédé original permettant de fonctionnaliser la surface des fibres par

électrodéposition de nanoparticules d'hydroxyapatite a été mise au point. Nous avons également développé la fonctionnalisation covalente des fibres notamment par chimie « click ».

Enfin, le quatrième chapitre est dévolu à l'évaluation biologique des matériaux élaborés. L'adhérence, la prolifération et la différentiation *in vitro* vers un phénotype ostéoblastique de cellules souches mésenchymateuses humaines ont été étudiées en collaboration avec le laboratoire sur la Croissance, Régénération et Réparation Tissulaires (CRRET) de l'Université Paris-Est Créteil (UPEC).

Chapitre 1

Etat de l'art sur les matériaux fibreux pour l'ingénierie tissulaire

1.1. Les biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire : définitions et concepts généraux

L'ingénierie tissulaire est un domaine fortement interdisciplinaire combinant les principes et les techniques des sciences de la vie avec ceux de l'ingénierie et de la chimie afin de développer des matériaux capables de soigner, améliorer ou remplacer des tissus malades ou endommagés.[1] Le principe général est d'associer une matrice tridimensionnelle avec des cellules autologues et des facteurs de croissance pour reconstruire un nouveau tissu hybride. Une des premières expériences démontrant que la génération d'un tissu peut être possible a été réalisée par Bisceglie en 1933 dans laquelle des cellules tumorales de souris ont été implantées au sein d'une membrane de polymère pour être insérées ensuite dans la cavité abdominale d'un porc.[2] Cette discipline émergente depuis les années 1990 dans le domaine biomédical s'étend de l'élaboration du matériau à implanter jusqu'au contrôle des réponses cellulaires, de la manipulation de l'environnement de cicatrisation jusqu'au contrôle de la structure du tissu régénéré, mais consiste aussi en la production de cellules et de tissus nécessaires pour les transplantations. L'objectif principal est le développement d'organes de remplacement, cependant, l'ingénierie tissulaire peut contribuer également à mettre au point des modèles d'études pour la biologie.

Selon Langer, trois stratégies ont été adoptées pour la création de nouveaux tissus. Cependant la méthode la mieux appropriée et la plus généralement utilisée est représentée par la **Figure 1-1**. Cette stratégie implique 5 étapes principales :

1) l'identification d'une source de cellules et leur prélèvement chez le patient.
2) leur multiplication et différentiation.
3) les cellules sont associées à une matrice (matériau biocompatible) ainsi qu'à des molécules bioactives. Le matériau est capable d'être utilisé comme support pour la croissance cellulaire (système ouvert) ou d'intégrer les cellules (système fermé). Cette structure doit être isolée ou synthétisée selon la forme et les dimensions désirées.
4) les cellules doivent être ensemencées uniformément sur et/ou dans le matériau puis proliférer dans un bioréacteur.
5) enfin, la « structure » d'ingénierie tissulaire est réimplantée chez le patient. Une vascularisation adéquate peut être nécessaire en fonction du site d'implantation.

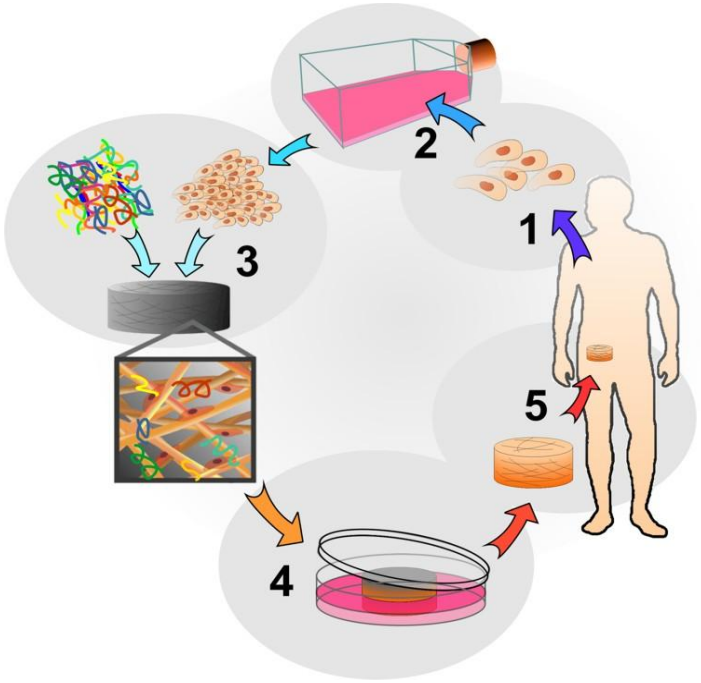


Figure 1-1: Schéma illustrant le concept de l'ingénierie tissulaire.

En utilisant cette approche, plusieurs équipes de recherche ont tenté d'élaborer les différents organes chez les mammifères. Des tissus produits par ingénierie tissulaire provenant de l'ectoderme ont été développés dans le cadre de déficience du système nerveux associant les maladies neurologiques, comme la maladie de Parkinson. Cet axe de recherche représente un des axes majeurs de l'ingénierie tissulaire.[3-5] D'autres études ont permis d'élaborer des tissus artificiels pour la régénération et la greffe de peau afin d'apporter une alternative aux traitements de brûlures [6-8] mais aussi vers la réalisation de cornées artificielles pour remplacer celles des patients atteints de cécité cornéenne.[9,10] Le développement d'organes de remplacement issus de l'endoderme a aussi été exploré avec des recherches portant sur le foie[11-13], la vessie [14-16] et l'urètre.[17, 18] Pour les tissus issus du mésoderme, les travaux d'ingénierie tissulaire ont permis de générer des fibres musculaires susceptibles d'être utilisées pour les traitements de muscles endommagés, des maladies cardiaques, des dystrophies musculaires [19-21] mais aussi pour la conception de vaisseaux sanguins artificiels.[21,22] Deux axes de recherche également très actifs sont ceux de l'ingénierie des tissus cartilagineux,[23-25] et en particulier des tissus osseux.[24, 26, 27] Ce sera d'ailleurs sur ce dernier domaine que nous focaliserons nos études.

Le traitement des sites osseux endommagés avec des biomatériaux est amplement pratiqué avec plusieurs degrés de réussite. La manipulation des biomatériaux associée au maniement des cellules issues de tissus est considérée comme une thérapie prometteuse, alternative à la chirurgie autologue.[1] La démarche d'utiliser l'ingénierie tissulaire afin de

permettre la reconstruction osseuse a acquis un intérêt significatif qui se traduit par une augmentation des recherches au cours de la dernière décennie (**Figure 1-2**). L'ingénierie tissulaire osseuse a été développée pour palier les limites des méthodes conventionnelles de traitement des pertes osseuses, à savoir la morbidité induite par les autogreffes ou le rejet des greffes de grandes étendues. D'autre part, cette approche nécessite la réalisation d'une matrice adaptée à la culture de cellules, appelée « scaffold », fournissant un support tridimensionnel poreux pour la colonisation des cellules, mais aussi prodiguant un développement cellulaire adéquat pendant la formation du tissu osseux analogue.[28]

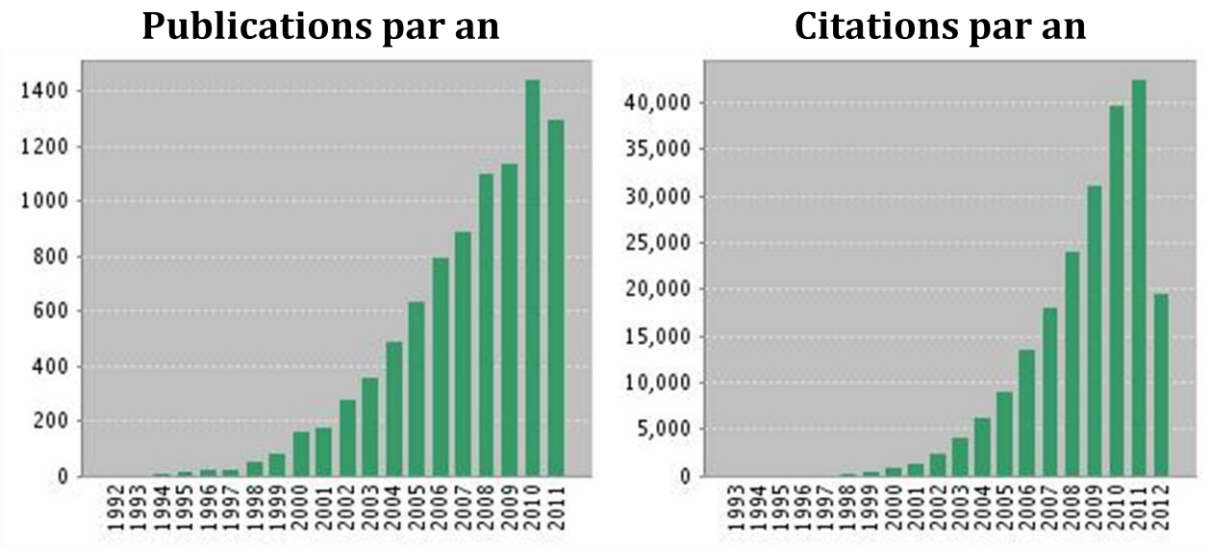


Figure 1-2: Graphiques reflétant le nombre de publications et de citations par an indexées sur l'ingénierie tissulaire osseuse
(Source: Web of Science ®; mot clé : bone tissue engineering).

Un élément clé dans le domaine de l'ingénierie tissulaire est l'utilisation de « scaffolds » bioactifs comme archétype pour favoriser les interactions cellulaires et la formation de la matrice extracellulaire (MEC), qui fournit un support structurel au tissu nouvellement généré. Les constituants majeurs de la MEC sont des protéines (élastine), des glycoprotéines (collagène, fibronectine, etc…), des glycoaminoglycanes, des protéoaminoglycanes et dans le cas de matrices osseuses des sels minéraux (hydroxyapatite et phosphate de calcium). La réalisation d'une architecture temporaire capable de mimer les fonctions physiologiques de la MEC est primordiale pour préserver la capacité des cellules à se différentier vers différents phénotypes mais aussi pour constituer un matériau apte à combler la lésion tissulaire. Dans l'optique d'élaborer la structure tridimensionnelle la mieux adaptée à la régénération osseuse, le matériau doit répondre à divers critères afin de remplir au mieux ces fonctions. Le matériau doit avant

tout être biocompatible, c'est-à-dire qu'il ne doit pas provoquer de réaction inflammatoire importante ni de toxicité au niveau des tissus receveurs et des cellules qu'il peut héberger.[24] Une interface optimale entre le matériau et le tissu hôte est nécessaire pour assurer le processus d'ostéoconduction qui définit la capacité du matériau à permettre l'adhésion, la migration des cellules, le développement d'un réseau vasculaire et le dépôt de tissus osseux. En plus des propriétés de biocompatibilité, les matériaux doivent présenter des propriétés mécaniques similaires à celles de la zone à remplacer et suffisantes pour maintenir la morphologie du biomatériau pendant le développement des cellules. La sélection des matériaux utilisés doit donc tenir compte de l'évolution de leur comportement mécanique au cours de leur dégradation afin qu'ils conservent leur intégrité structurelle jusqu'à la formation du nouveau tissu biologique.[24] Par conséquent, la biodégradation et biorésorption doit s'effectuer à un taux comparable à celui de la génération et du remodelage des tissus en cours de formation.

Une condition supplémentaire et nécessaire pour le développement d'architectures destinées à la régénération osseuse est la présence d'une porosité interconnectée permettant de diriger la croissance cellulaire vers la forme physique désirée et surtout la vascularisation du tissu généré.[29] L'existence d'interconnections entre les pores influence directement la diffusion des nutriments physiologiques vers les cellules et l'évacuation des déchets produits.[30] D'autre part, Kuboki *et al.*[31] ont démontré que la présence de pores favorise la migration et la prolifération d'ostéoblastes ou de cellules mésenchymateuses mais aussi l'ostéogénèse. Par ailleurs, une structure poreuse mène à de meilleurs points d'ancrage entre le biomatériau implanté et l'os environnant ce qui assure une stabilité mécanique supérieure à l'interface.[32]

1.1.1. Les biomatériaux pour l'ingénierie des tissus osseux

Les principaux biomatériaux utilisés en ingénierie tissulaire osseuse sont des métaux, des céramiques, des polymères ou des matrices composites.

1.1.1.1 Les métaux

Les implants métalliques sont les matériaux les plus utilisés en réparation osseuse en raison de leurs bonnes propriétés mécaniques et des données cliniques importantes. Les matériaux classiquement utilisés sont composés soit d'acier inoxydable, de titane ou d'alliage de titane. La partie principale est constituée de métal solide tandis qu'une surface poreuse est

générée grâce à un revêtement de particules de titane d'une épaisseur allant de quelques nanomètres jusqu'à des centaines de micromètres selon la technique de fabrication.[32-35] Différentes techniques d'élaboration de revêtements poreux ont été utilisées telles que la pulvérisation plasma,[36] le frittage, l'usinage ou la gravure par traitement acide en fonction de la porosité et de la gamme de pores requise pour l'application.[37] Par ailleurs, Van den Dolder *et al.*[38] ont élaboré un maillage de fibres de titane poreux à 86 % et une taille de pores moyenne de 250 µm pour la culture *ex-vivo* de cellules stromales de la moelle osseuse de rats. Le principal avantage des implants métalliques est leurs excellentes propriétés mécaniques entraînant leur utilisation largement répandue dans les chirurgies réparatrices des os. Cependant, la faible adhérence des tissus [39] ainsi que leur non-dégradabilité nécessite une seconde chirurgie afin de retirer l'implant. Dans le cas des implantations permanentes, il existe un risque de toxicité lié à l'accumulation des ions métalliques en raison de la corrosion.[40]

1.1.1.2 Les céramiques

Depuis les 30 dernières années, l'utilisation d'implants à base de céramiques phosphocalciques synthétiques pour diverses applications cliniques allant de l'odontologie [41] à la chirurgie plastique [42] s'est beaucoup développée en raison de leur composition voisine de celle de la phase minérale de l'os humain.

La famille des biocéramiques phosphocalciques (CaPs) comprend principalement les phosphate tricalciques ($Ca_3(PO_4)_2$, TCPs) et les apatites avec en particulier l'hydroxyapatite (HA) qui est présente naturellement dans l'os. En effet, environ 60 % (g/g) de l'os est constitué d'hydroxyapatite ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$). Cette céramique présente une très faible résorption naturelle, c'est pourquoi, elle est également associée à un autre phosphate de calcium, le phosphate tricalcique pour former des céramiques biphasées, pour diverses applications dans le domaine de l'ingénierie tissulaire.[27, 43] Il existe deux formes cristallines différentes. La forme α, trop soluble n'est pas adaptée à une application de reconstruction tissulaire. Seule la forme cristalline β (forme stable à température ambiante du TCP) est utilisée en chirurgie osseuse. Grâce à leur structure chimique équivalente à celle des minéraux présents dans l'os, les CaPs possèdent une excellente biocompatibilité montrant de remarquables résultats d'adhérence, de prolifération et de différentiation qu'ils soient de phases cristallines ou amorphes et sous toutes les formes (revêtement, poudre ou système poreux) avec des cellules souches ou des ostéoblastes.[44] A la différence de l'hydroxyapatite, le phosphate tricalcique ne stimule pas la croissance osseuse. De plus, l'intérêt de réaliser des « scaffolds » constitués d'hydroxyapatite se trouve également dans les propriétés d'ostéoconduction et ostéoinduction de cette

biocéramique générant alors des matériaux à fort potentiel dans le domaine de la régénération osseuse.[45]

L'élaboration d'un matériau poreux à base d'une biocéramique peut être effectuée par différentes techniques telles que le lavage et/ou le frittage de sels ou de microparticules de polymères menant dans la majorité des cas à la formation d'une structure à pores sphériques interconnectés.[45] A titre d'exemple, une architecture poreuse peut être réalisée après le lavage d'une matrice de cellulose ayant servie de moule à la pâte d'hydroxyapatite[46] ou encore par l'utilisation de peroxyde d'hydrogène comme agent moussant.[47]

Néanmoins, les céramiques sont soumises à une très longue durée de résorption de l'ordre de plusieurs années. La vitesse de dégradation dépend de plusieurs paramètres dont la porosité et la cristallinité des céramiques à base de CaP. En effet, des cinétiques très faibles ont été rapportées pour des structures faiblement poreuses et fortement cristallines.[27] Le taux de dissolution diminue selon cet ordre : Hydroxyapatite amorphe > α-TCP > β-TCP > Hydroxyapatite cristalline. Un autre inconvénient réside dans les propriétés mécaniques insuffisantes de l'hydroxyapatite et des céramiques à base de CaP associées. L'utilisation de ces biocéramiques pour la régénération tissulaire demeure limitée en raison de leur fragilité qui est amplifiée après la création des pores. En effet, l'os est caractérisé par une résistance à la rupture significativement plus élevée, ce qui nécessite de coupler des céramiques à base de CaP avec un autre matériau au comportement mécanique complémentaire (un polymère, par exemple) afin de les utiliser de manière appropriée pour la reconstruction osseuse.[26, 27]

D'autres céramiques comme les verres bioactifs - découverts par Hench en 1969 – ont été largement étudiés en raison de leur capacité à se lier à des tissus osseux.[48] Les verres bioactifs les plus utilisés sont produits dans des conditions similaires à la fabrication du verre classique où les composants de base sont SiO_2, Na_2O et P_2O_5 et sont disponibles commercialement sous le nom de Bioglass®. D'autre part, plusieurs travaux ont rapporté que les verres bioactifs sont capables de supporter l'activité enzymatique,[49] la vascularisation,[50] de favoriser l'adhérence d'ostéoblastes ainsi que la différentiation de cellules mésenchymateuses en ostéoblastes.[51, 52] Leur capacité à créer des liaisons osseuses est fondée sur la réactivité chimique du verre bioactif au sein duquel les liaisons entre les atomes de silicium sont rompues, permettant à la couche de CaP de se déposer à la surface et de cristalliser en hydroxyapatite carbonatée. Cependant, les propriétés mécaniques de cette classe de céramique restent insuffisantes, ce qui limite leur application en ingénierie tissulaire.

1.1.1.3 Les polymères naturels

Dans l'objectif d'améliorer la biocompatibilité des matériaux, les polymères, d'origine naturelles ou synthétiques, offrent des caractéristiques parfaitement adaptées à l'ingénierie tissulaire. Outre leur biodégradabilité qui est un atout majeur et, pour certains, leur faible coût, ils offrent une multitude d'avantages tels qu'une activité biologique remarquable ou encore de meilleurs résultats d'adhérence et de prolifération cellulaire. Cependant, leurs propriétés mécaniques parfois inadaptées ou encore la faible ostéoconductivité demeurent des inconvénients majeurs compromettant leur utilisation unique comme structure tridimensionnelle. En effet, leur solubilité dans l'eau, leur dégradation rapide ou la possible perte de leurs propriétés biologiques durant leur formulation sont des obstacles à surmonter afin d'améliorer leur stabilité. De plus, le risque de rejet immunitaire ou de transmission de pathologies des biomatériaux à base de polymères naturels ne peut être négligé, ce qui nécessite de pratiquer des dépistages appropriés ainsi que des purifications.[53, 54]

- Les protéines

L'utilisation de macromolécules biologiques, naturellement présentes dans la MEC, pour l'élaboration de structures à base de polymères naturels conduit à des matériaux attractifs capables de promouvoir une information biologique mais aussi de mimer la MEC améliorant ainsi l'adhérence et la prolifération des cellules. D'autre part, les interactions entre ces protéines et les cellules permettent de potentiellement moduler leurs fonctions pour favoriser la différentiation cellulaire.[53, 55]

Le collagène est considéré par beaucoup comme la protéine idéale dans le cadre de l'élaboration d'une matrice pour l'ingénierie tissulaire, étant donné qu'il est le composant majeur de la MEC et donc capable de fournir un support structurel et mécanique pour divers tissus (peau, os, vaisseaux, etc.…).[56] De plus, il a été rapporté que le collagène interagit avec les cellules et transduit les signaux essentiels pour le développement cellulaire.[57] Outre son activité biologique, son excellente biocompatibilité et sa capacité à améliorer l'adhérence cellulaire, le collagène est aussi biodégradable et faiblement antigénique, ce qui en fait un matériau de choix dans le domaine de l'ingénierie tissulaire.[56] Plusieurs investigations biologiques ont démontré que l'élaboration de structures tridimensionnelles à base de collagène améliore la croissance et le développement cellulaire[58, 59] mais aussi la différentiation des ostéoblastes qui conduisent à une augmentation de la quantité de minéraux osseux formés.[60,61] Cependant, le principal inconvénient de tels biomatériaux appliqués à la reconstruction tissulaire est le fort taux de

dégradation conduisant à une perte rapide des propriétés mécaniques.[62] Plusieurs tentatives d'élaboration de nouvelles matrices composites, associant protéines et divers composants inorganiques et/ou un polymère synthétique ont permis d'améliorer les propriétés mécaniques et de ralentir la biodégradabilité des matériaux.[63, 64] Le recours à des procédés de réticulation en présence de glutaraldéhyde [65] ou d'autres agents réticulants comme les carbodiimides a également été étudié afin d'améliorer la résistance mécanique.[66] Cependant, cette dernière méthode entraîne l'apparition d'une certaine toxicité amenée par les agents de réticulation. D'autres stratégies consistent à modifier chimiquement les chaînes latérales du collagène afin de former des doubles liaisons réticulables par polymérisation radicalaire [67] ou à générer une réticulation sous l'action d'enzymes. [68]

La gélatine est un polymère naturel dérivé du collagène couramment utilisée pour les applications pharmaceutiques et médicales, en raison de sa biocompatibilité et de sa biodégradabilité dans des environnements physiologiques.[69] Des structures tridimensionnelles sous forme de fibres ou d'hydrogels à base de gélatine ont été élaborées et évaluées dans diverses études *in-vitro*.[70, 71] Les résultats ont montré que la présence de gélatine conduit à une remarquable adhérence et prolifération des cellules pouvant être expliquée par la présence de groupements carboxyle, générés lors de sa fabrication par hydrolyse du collagène. Ces fonctions sont capables de complexer les protéines de la membrane cellulaire mais aussi du milieu de culture.[55] Malgré d'excellentes propriétés biologiques, les structures à base de gélatine doivent généralement être réticulées afin de conserver leur morphologie, impliquant les mêmes risques de toxicité que ceux précédemment décrits.

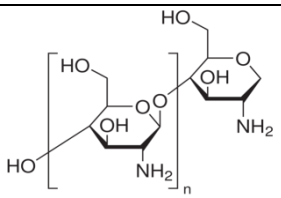
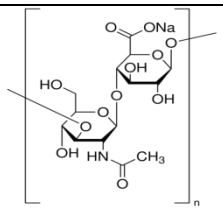
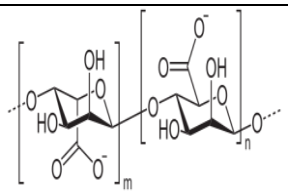
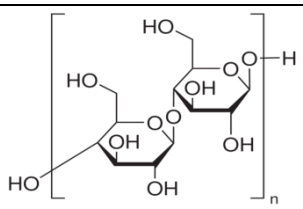
Un autre polymère naturel utilisé à un degré inférieur est la fibroïne de la soie qui est une protéine fibreuse formant des filaments aux propriétés chimiques et physiques remarquables.[72] Ces fibres de soie se composent d'un cœur en fibroïne tandis que la surface est recouverte de séricines, protéines capables de coller les fibres entre elles.[73] Ces matériaux naturels utilisés pendant plusieurs dizaines d'années comme sutures pour des applications biomédicales possèdent un fort potentiel dans le domaine des biomatériaux pour l'ingénierie des tissus osseux grâce à leurs propriétés répondant aux exigences des structures réalisées ainsi que leur biocompatibilité rapportée lors de divers travaux.[74, 75] Ils sont caractérisés par une lente dégradabilité, une résistance élevée et sont relativement flexibles. Ils peuvent également être façonnés sous différentes formes : poudre, gel, mousse, membrane pour s'adapter à leurs utilisations futures. De plus, leur surface peut être facilement modifiée grâce à la présence de fonctions amine et acide en chaîne latérale. Cependant, l'une des préoccupations majeures liée à la soie est la nécessité d'éliminer les risques de contamination de la séricine susceptibles de déclencher une réponse immunitaire négative au niveau du site d'implantation. Dans de rares

cas, un granulome peut se former à la suite d'une réponse phagocytaire à la soie imputable à l'activité des macrophages et des cellules géantes à corps étranger.[74]

- Les polysaccharides

Les polysaccharides sont une classe de biopolymères constitués de sucres simples.[76] Ces monosaccharides sont liés entre eux par des liaisons O-glycosidique avec n'importe quels groupements hydroxyle, ce qui confère au polysaccharide la capacité de former des polymères linéaires et ramifiés. Ces sucres peuvent être obtenus à partir de différentes sources : microbienne, animale ou végétale.[77] La biocompatibilité des polysaccharides, atout majeur de ces polymères naturels, repose essentiellement sur leur structure chimique qui est voisine de celle de l'héparine. Ils sont capables, par ailleurs, de mimer les propriétés biologiques et structurelles de la MEC. Les polysaccharides ne sont pas toxiques, sont solubles dans l'eau et montrent des interactions favorables avec les cellules et présentent également un faible coût en comparaison avec d'autres polymères naturels comme le collagène.[78] Par conséquent, les polysaccharides ont été largement étudiés comme structures pour des applications en ingénierie tissulaire ainsi que pour la vectorisation de principes actifs.

Tableau 1-1 : Formules chimiques de divers polysaccharides

Chitosane	Acide hyaluronique	Alginate	Cellulose
			

Le chitosane (**Tableau 1-1**) est un aminopolysaccharide cationique et biodégradable dérivé de la désacétylation partielle de la chitine. La production de chitine par biomasse est aussi abondante que celle de la cellulose et sa production annuelle est estimée à 10^{10}-10^{12} tonnes. Ce polysaccharide a attiré l'attention de plusieurs équipes de recherche pour des applications en vectorisation de médicaments ou en ingénierie tissulaire (de la peau, des os, du cartilage et des vaisseaux) en raison de ses propriétés de biodégradabilité, de biocompatibilité, ses interactions favorables avec les cellules, son activité antibactérienne et antifongique, d'hémostasie ainsi que son caractère non-antigénique.[79, 80] De plus, il peut être mis en œuvre sous différentes formes galéniques comme les films, les mousses, les fibres, les poudres, etc.…[81] Toutefois, comme la majorité des polymères naturels, il est nécessaire de le réticuler afin qu'il conserve sa forme

prédéfinie avec le glutaraldéhyde [82] ou dernièrement avec la génipine qui est un agent de réticulation naturel.[83] D'autre part, il a été montré que l'incorporation de céramiques CaP ou d'un polymère synthétique tel que le poly(acide lactique) (PLA) au sein de la structure, permet d'améliorer significativement les propriétés mécaniques.[84,85] L'élaboration de matrices poreuses à base de chitosane a montré un fort potentiel pour la médecine régénérative notamment du cartilage en raison de leur homologie de structure avec les glycoaminoglycanes de la MEC.[80] Plusieurs architectures composites associant chitosane et hydroxyapatite, utilisées pour la régénération osseuse, améliorent l'adhérence, la prolifération et la différentiation d'ostéoblastes.[86,87] Par ailleurs, d'autres travaux portant sur la combinaison du chitosane avec des facteurs de croissance tel que l'imidazole ou encore la culture *in-vitro* de cellules souches mésenchymateuses ont rapporté la capacité à stimuler la formation osseuse.[88, 89]

Un polysaccharide linéaire de masse molaire élevée, l'acide hyaluronique ou hyaluronane (**Tableau 1-1**), a également été très étudié en raison de sa structure polyanionique dans les conditions *in-vivo*.[90] Ce glycoaminoglycane non-sulfaté est le composant majeur de la matrice intercellulaire des tissus conjonctifs comme le cartilage, l'humeur vitreuse de l'œil humain ou encore le cordon ombilical.[90] Le hyaluronane n'est pas seulement un élément structurel de la matrice intercellulaire, il peut également interagir avec les protéines d'adhésion, les protéoglycanes et autres molécules bioactives, se comporter comme lubrifiant articulaire protégeant le cartilage ou encore piéger les radicaux libres.[91] De plus, le hyaluronane est caractérisé par des récepteurs spécifiques de la régulation du développement cellulaire, de l'inflammation, de l'angiogénèse, des processus de cicatrisation et est capable d'agir tel un revêtement protecteur et sélectif autour de la membrane cellulaire.[92] Affichant une biocompatibilité effective, le hyaluronane a été largement utilisé dans des applications biomédicales [93, 94] et plus précisément en ingénierie tissulaire en raison de ses propriétés non immunogènes ainsi que pour les interactions entre ses récepteurs et les cellules conduisant à un remodelage aisé de la MEC.[91] Cependant, certaines études ont montré que la surface hydrophile et polyanionique de biomatériaux à base de hyaluronane ne semble pas induire la formation de tissu,[95] c'est pourquoi plusieurs équipes ont travaillé sur un revêtement de la surface par des protéines de la MEC telles que le collagène ou la fibronectine afin d'améliorer la réponse cellulaire.[96] Plusieurs évaluations biologiques *in-vitro* et *in-vivo* ont été rapportées où la culture de chondrocytes sur des structures tridimensionnelles à base de hyaluronane conduit à la formation de tissus cartilagineux.[97, 98] Néanmoins les propriétés physiques de ce polysaccharide telles que sa solubilité dans l'eau, sa résorption rapide ainsi que ses faibles propriétés mécaniques limitent ses applications en tant que biomatériaux. Par conséquent, une réticulation chimique par des agents le plus souvent toxiques est nécessaire afin d''améliorer la stabilité de la structure tridimensionnelle.[91, 92]

L'alginate (**Tableau 1-1**) est un polysaccharide anionique linéaire extrait des algues marines brunes[99] également largement étudié comme support tridimensionnel sous différentes formes (gels, mousses ou encore microfibres) pour des applications en ingénierie tissulaire de l'os,[100] du cartilage,[101] de la peau[102] ou du foie.[103] Ce polysaccharide est principalement étudié sous forme d'hydrogel pour des applications de régénération tissulaire étant donné qu'il est capable de former très simplement des ponts de réticulation grâce à des cations divalents.[104] Cette structure biocompatible, non immunogène et bon marché offre un support adapté au développement *in-vitro* d'ostéoblastes [105], de chondrocytes [106] et de cellules souches [107] mais également *in-vivo* avec l'observation d'une rapide vascularisation.[101,108] Cependant, les applications en tant qu'hydrogel restent limitées en raison des faibles propriétés mécaniques, des difficultés de manipulation, de stérilisation, de la faible cinétique de dégradation et du contrôle limité des cinétiques de gélification.[109, 110]

D'autres polysaccharides, tels que le dextrane ou la cellulose (**Tableau 1-1**), ont été étudiés à un degré inférieur pour des applications en tant que supports pour l'ingénierie tissulaire. Le dextrane est un polymère ramifié, hydrophile, possédant une structure chimique similaire à celle des glycoaminoglycanes,[53] biodégradable, biocompatible et capable de supporter la croissance de cellules pour la cicatrisation osseuse ou dentaire.[77] Il est principalement élaboré sous forme d'hydrogels par des réticulations chimiques ou physiques offrant un support tridimensionnel pour la culture cellulaire. Cependant, il est souvent nécessaire de l'associer avec des polymères synthétiques afin d'améliorer ses propriétés mécaniques et réduire les difficultés de manipulation et de stérilisation.[111-114] La cellulose connait un intérêt particulier grâce à son abondance en tant que ressource renouvelable, son faible coût, sa biodégradabilité et sa biocompatibilité.[80] Des biomatériaux à base de cellulose ont été utilisés pour des applications d'ingénierie de vaisseaux sanguins,[115] de cicatrisation des plaies [116] et ont également été étudiés *in-vivo*.[117] Cependant, sa très faible solubilité inhérente aux liaisons hydrogène inter et intramoléculaires complique la mise en œuvre de tels matériaux.[118] Des biomatériaux à base d'amidon ou d'agarose ont également suscité l'intérêt de plusieurs équipes de recherche pour des applications dans le domaine biomédical.[105, 119, 120]

1.1.1.4 Les polyesters aliphatiques

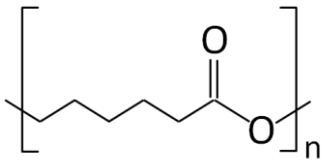
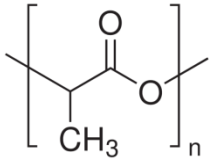
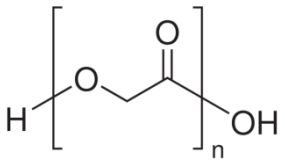
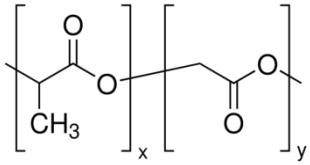
Les polyesters aliphatiques présentent des propriétés physiques, chimiques, de dégradation prévisibles et reproductibles pouvant être modulées afin de répondre aux exigences spécifiques de différentes applications. De plus, ils peuvent être aisément mis en œuvre dans les formes et les tailles désirées en fonction de la zone ciblée. La grande variété de copolymères

synthétiques et la possibilité de les mélanger avec d'autres polymères synthétiques ou naturels, ou encore avec d'autres matériaux tels que des céramiques bioactives, offrent un large éventail de propriétés à l'origine de l'engouement de cette classe de matériaux. Les risques potentiels de toxicité, de réponse immunogène et d'infections sont faibles pour les polymères purs, constitués de structures simples et bien définies. Cependant, leur surface hydrophobe ainsi que l'absence de récepteur ou de site biologique favorisant les réponses cellulaires accroit la durée d'adaptation pour les cellules.[121]

- Les polyesters synthétiques

Les polyesters biodégradables communément utilisés comme structures tridimensionnelles dans l'ingénierie tissulaire sont les poly(α-hydroxy acide)s comme le PLA, le poly(acide glycolique) (PGA) et leurs copolymères le poly(acide lactique-*co*-acide glycolique) (PLGA) (**Tableau 1-2**).[122] La poly(ε-caprolactone) (PCL) (**Tableau 1-2**) et ses copolymères synthétisés en présence de lactide ou de glycolide sont également largement étudiés dans le domaine biomédical, car ils possèdent l'approbation de l'U.S. Food and Drug Administration. Ils sont principalement utilisés comme sutures, pansements et prothèses endovasculaires.[123] Ils peuvent être facilement mis en œuvre et leurs propriétés de dégradation sont ajustables en fonction de la masse molaire ou de la proportion de chaque comonomère dans le copolymère. Toutefois, le mécanisme de dégradation fondé sur l'hydrolyse aléatoire des liaisons ester dans la chaîne de polymère peut conduire à un effondrement prématuré de la structure. De plus, la génération de produits de dégradation acides entraîne dans certains cas une réponse inflammatoire aigüe.[124] La cinétique de dégradation peut être influencée par différents facteurs tels que la cristallinité, la structure, la composition chimique ou encore la balance hydrophobe/hydrophile.[125] En effet, la vitesse de dégradation d'un échantillon de PLGA est supérieure à celle d'un échantillon de PLA en raison de la meilleure diffusion des molécules d'eau au sein des chaînes macromoléculaires.[126] D'autre part, la PCL étant très hydrophobe et cristalline, sa vitesse de dégradation par hydrolyse est très lente allant jusqu'à plusieurs années dans les conditions *in-vivo*.[127]

Tableau 1-2 : Formules chimiques de divers polyesters aliphatiques

PCL	PLA	PGA	PLGA
			

La PCL et ses copolymères sont utilisés dans plusieurs axes de l'ingénierie tissulaire tels que la régénération des nerfs avec la formation de véritables canaux (**Figure 1-3**),[128] des tissus cérébraux,[129] ou encore des tissus vasculaires.[130,131] Le domaine de la régénération osseuse a également été l'objet d'un grand nombre d'études montrant d'intéressantes interactions entre les structures à base de PCL et les ostéoblastes.[132,133] Dans l'optique d'accélérer et d'améliorer la reconstruction osseuse, l'introduction de biocéramiques telles que l'hydroxyapatite ou les phosphates tricalciques favorisent la minéralisation des cellules en développement et améliorent les propriétés mécaniques des biomatériaux.[134,135] Une autre approche, développée par Savarino *et al.*[136], consiste à élaborer une structure poreuse à base de PCL comme support de cellules souches exprimant la BMP-4 (Bone Morphogenetic Protein, facteur ostéogénique). Après implantation dans la zone endommagée d'un fémur de lapin, les études ont révélé une ostéoinduction à l'origine de la formation d'un néotissu ainsi que sa vascularisation. Les structures poreuses et fibreuses à base de PCL permettent le maintien de la structure tridimensionnelle dans les conditions physiologiques ainsi qu'une prolifération et une différentiation cellulaire offrant un dispositif prometteur pour les tissus conjonctifs.[137, 138]

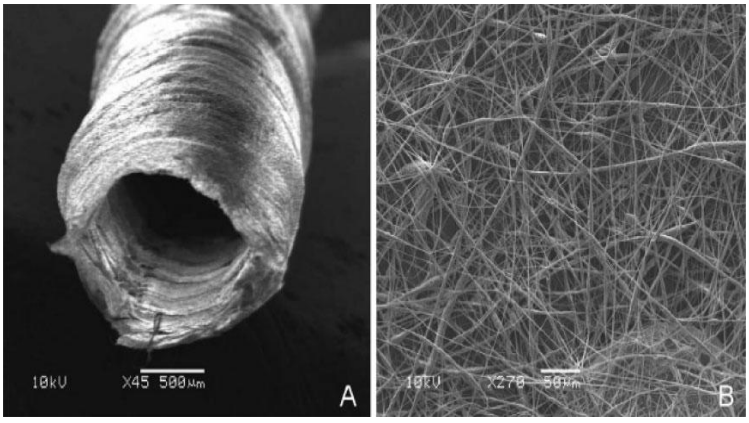


Figure 1-3 : Images MEB d'un canal en PCL pour la régénération nerveuse (A) et des fibres à plus fort grossissement (B).[128]

De façon similaire, le PLA et le PLGA ont été largement étudiés pour reconstruire différents types de tissus comme les nerfs, la peau et les os.[139-143] L'utilisation de polymères synthétiques dans le domaine de la régénération osseuse est en pleine expansion, en particulier grâce à l'utilisation de biocéramiques au sein de la matrice polymère. En effet, l'élaboration de divers biomatériaux poreux à base de PLA associés à des verres bioactifs ou à l'hydroxyapatite améliore la sécrétion de collagène, la croissance, ainsi que la minéralisation des ostéoblastes sur le matériau composite.[144-146] Comme précédemment mentionné, l'inconvénient majeur des polyesters est leur hydrophobie qui ne favorise pas la régénération des tissus du fait du faible mouillage et induit des interactions faibles avec les cellules [121]. Afin de surmonter ce problème, différentes équipes de recherche ont incorporé un ou plusieurs polymères naturels tels que le collagène, la gélatine pour augmenter l'affinité cellulaire avec la structure.[147, 148] Prabhakaran *et al.*[149] ont développé des fibres d'un mélange PLA/collagène où des nanoparticules d'hydroxyapatite sont incorporées afin de mimer au mieux la matrice osseuse et ainsi promouvoir la reconstruction osseuse. Les résultats ont montré des améliorations significatives de la prolifération des ostéoblastes grâce à la présence de collagène, mais aussi de la minéralisation de la matrice confirmées par la présence de dépôts minéraux (**Figure 1-4)**. D'autres équipes utilisent des facteurs bioactifs afin d'améliorer la bioactivité du biomatériau tels que les protéines BMP-2 et BMP-7 impliquées dans la formation osseuse.[150, 151]

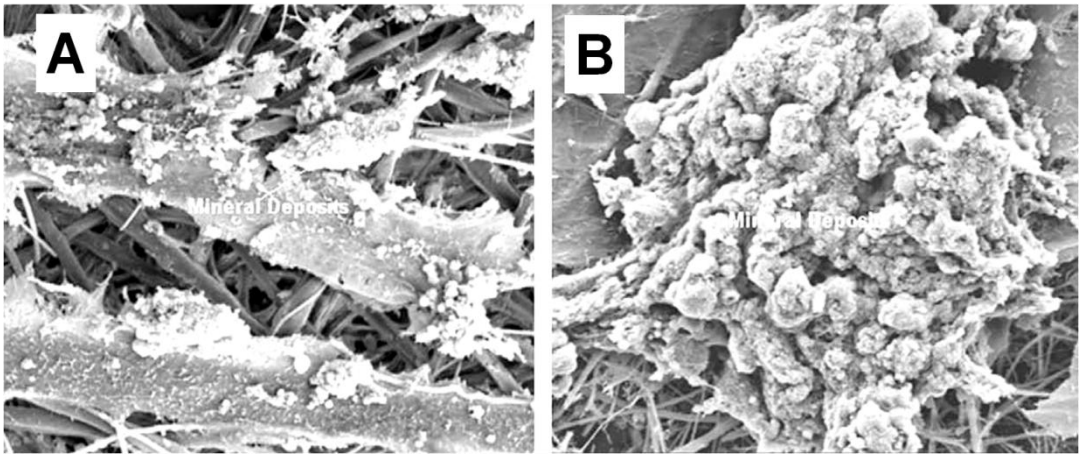


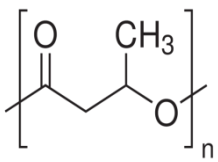
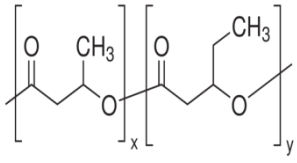
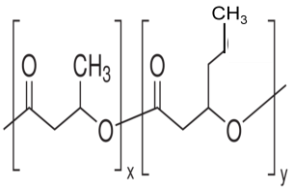
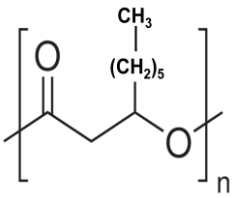
Figure 1-4 : Images de MEB présentant A) les ostéoblastes humains en contact avec les fibres et B) un dépôt minéral sécrété par les cellules.[149]

- Les polyesters d'origine microbienne

En 1926, Lemoigne décrit pour la première fois le poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) comme un constituant de la bactérie *Bacillus megaterium*. Le PHB est le membre le plus simple

de la famille des poly(3-hydroxyalcanoate)s (PHAs) produits par plus de 90 microorganismes comme réserve intracellulaire de carbone et d'énergie lorsqu'ils sont soumis à un déficit de certains nutriments.[152, 153] Les PHAs sont des substrats attractifs pour l'élaboration de biomatériaux pour diverses applications de dispositifs médicaux et d'ingénierie tissulaire grâce à leur biocompatibilité, leur facilité de mise en œuvre ainsi que leurs propriétés mécaniques et leur caractère biodégradable. Parmi les différents PHAs, le PHB, le poly(4-hydroxybutyrate) P4HB, le poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalérate) (PHBHV), le poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx) et le poly(3-hydroxyoctanoate) (PHO) (**Tableau 1-3**) sont ceux qui ont fait l'objet du plus grand nombre d'études.[154] Les propriétés physiques des PHAs peuvent être ajustées avec la longueur de la chaîne latérale. A titre d'exemple, le PHB est un homopolymère thermoplastique rigide et cassant alors que le copolymère de PHBHV a une cristallinité, un point de fusion et une rigidité inférieurs en raison de l'incorporation de monomères avec une chaîne latérale plus longue. D'autre part, le PHO est un élastomère caractérisé par une faible cristallinité, une faible température de transition vitreuse, une faible contrainte de traction et une grande élongation à la rupture.[155] Les longues chaînes latérales, à l'origine d'une cristallinité plus faible, favorisent la diffusion des molécules d'eau au sein du polymère et donc sa dégradation. En outre, les produits de dégradation des PHAs entraînent des inflammations moins importantes en comparaison de celles observées avec les poly(α-hydroxy acide)s. Néanmoins, leurs principaux inconvénients sont leur disponibilité limitée et leur durée d'extraction à partir de la biomasse relativement longue.[156] Cependant, l'intérêt soutenu des secteurs académiques et industriels pour la production de PHAs à partir de différentes ressources renouvelables tend à palier les lacunes de ces biopolymères.[53, 154]

Tableau 1-3 : Formules chimiques des principaux PHAs.

PHB	PHBHV	PHBHHx	PHO
			

Les PHAs sont étudiés comme implants dans le domaine biomédical depuis plusieurs années.[156] Vergnol *et al.* ont développé des PHAs contenant du sirolimus, agent anti-proliférant, afin d'être déposés sur des prothèses métalliques.[157] Ils sont également adaptés aux applications de reconstruction de cartilage,[158,159] de peaux avec des mélanges PHB/Poly(alcool vinylique) apportant de l'hydrophilie,[160] ou encore de reconstruction de vaisseaux sanguins notamment

avec l'implantation chez l'agneau de valves cardiaques en PHO (**Figure 1-5**) qui seront recouvertes par un néotissu formé après 17 semaines.[161-163] Les PHAs ont également prouvé leur pertinence pour la régénération des tissus nerveux.[164] Brian *et al.* ont élaboré une matrice poreuse en PHBHHx pouvant être utilisée comme conduit dans une zone endommagée de 10 mm dans le nerf sciatique d'un rat. Après un mois, il est possible d'enregistrer des potentiels d'action du muscle indiquant la présence d'un nerf périphérique fonctionnel et la rapide régénération du nerf endommagé.[165]

Figure 1-5 : Valve cardiaque en PHO implantée pendant 17 semaines chez un agneau.[161]

Les perspectives d'utilisation des PHAs pour la régénération des tissus osseux ont été évaluées grâce à de nombreuses études rapportées dans les revues de Chen *et al.*[156] et Misra *et al.* [166]. Le PHB a démontré sa capacité à produire une adaptation uniforme et favorable au sein des tissus osseux sans aucune réaction inflammatoire aigüe ni effondrement de sa structure après implantation durant une période de 12 mois, dans les conditions *in-vitro* et *in-vivo*.[167] D'autre part, des études plus récentes ont révélé que les mousses poreuses à base de PHBHV possèdent un fort potentiel de régénération lorsqu'elles sont implantées dans une zone endommagée d'un fémur de rat.[168] De manière similaire aux structures à base de PLA ou de PCL, les matrices à base de PHAs présentent une activité biologique limitée défavorable aux interactions avec les cellules. Durant ces dernières années, de nombreuses investigations ont été menées sur des architectures composites à base de PHB renforcées par des biocéramiques afin d'améliorer la bioactivité du matériau.[166, 169] Tout d'abord, des structures à base de PHB et de PHBHV renforcées par des cristaux d'hydroxyapatite présentent une amélioration des propriétés mécaniques avec une compression et une résistance du même ordre de grandeur que plusieurs ossements humains.[166, 167] Par ailleurs, il est également important de remarquer l'augmentation de l'activité cellulaire et notamment la forte minéralisation d'ostéoblastes

MC3T3-E1 en présence de biocéramiques associées à une matrice PHA dans les conditions *in-vitro*.[170, 171] D'autre part, Luklinska *et al.*[172] ont montré que des implants à base de PHBHV et d'hydroxyapatite impliqués dans la régénération osseuse sont morphologiquement, chimiquement et biologiquement actifs durant les tests *in-vivo* au cours desquels des ostéoblastes et des ostéocytes ont été détectés à l'interface et où une épaisseur de 770 µm d'un nouvel os a été mesurée après 6 mois d'implantation. D'autres travaux sur des matrices composites associant PHAs et verre bioactifs ont rapporté une stimulation de l'ostéoinduction.[166, 173]

D'autres polymères synthétiques ont également été étudiés, à un plus faible degré, pour l'ingénierie tissulaire, à savoir, les poly(uréthane)s [174], le poly(propylène fumarate) [175] ou encore les poly(phosphazène)s.[176]

1.1.2. Les principales stratégies d'élaboration de structures poreuses pour l'ingénierie tissulaire

Au sein des systèmes vivants, les cellules collectent une multitude de signaux par des voies de communication avec les cellules adjacentes et, plus important, le développement cellulaire est influencé par des informations biochimiques et biophysiques complexes prodiguées par la MEC.[177] Les cellules sont incluses dans la MEC dont le réseau souple joue un rôle mécanique important qui protège les cellules des contraintes mécaniques externes.[178] En outre, la MEC offre un support approprié pour l'adhérence, la prolifération, la migration et la différentiation cellulaire en raison des interactions moléculaires entre les récepteurs de la membrane cellulaire et les signaux émis par les protéines environnantes.[179] Par conséquent, afin de parvenir à la régénération des tissus d'une zone ciblée, les structures élaborées doivent s'inspirer de la conception naturelle et prodiguer des informations aux cellules tout en leur offrant un support de croissance adapté.[180] Dans les sections suivantes, nous allons présenter les procédés principalement utilisés pour la fabrication de matrices destinées à l'ingénierie tissulaire. Les méthodes de fabrication ne doivent pas altérer les propriétés chimiques et de biocompatibilité des matériaux ce qui les rendraient préjudiciables lors de leur utilisation clinique. De plus, il est nécessaire que ces techniques génèrent une architecture tridimensionnelle homogène et précise, une porosité élevée et interconnectée ainsi qu'une reproductibilité appropriée.[109] D'un point de vue pratique, le matériau doit être disponible sous différentes formes galéniques (granules, poudres, monolithes) qui permettront d'appréhender

tous les types de lésions. Les matériaux injectables sont de plus en plus privilégiés car ils impliquent des interventions chirurgicales moins invasives.

1.1.2.1 Elaboration de mousses

Les mousses sont des structures poreuses de très faible densité aux propriétés dépendantes de la taille des pores, de leur porosité ainsi que de l'interconnectivité des pores. La porosité influence la surface spécifique et donc l'adhérence des cellules tandis que l'interconnectivité et la taille des pores influencent leur migration, leur infiltration et la circulation des déchets et nutriments.[181] A ce jour, différentes méthodes permettent la formation des mousses comme le lavage d'agents porogènes, la lyophilisation, l'utilisation de fluides supercritiques ou la séparation de phases induite thermiquement.

- L'extraction d'agents porogènes

Cette méthode permet de préparer des structures poreuses avec une porosité régulière mais une épaisseur limitée. Cette technique implique de solubiliser le polymère dans un solvant approprié (souvent organique) puis de couler cette solution dans un moule contenant des particules porogènes.[182] Les agents porogènes couramment utilisés peuvent-être des sels inorganiques comme le chlorure de sodium, des cristaux de saccharose, ou encore des sphères de gélatine ou paraffine. D'autre part, la taille du porogène ainsi que le rapport polymère/porogène affectent directement la taille des pores, la porosité et la morphologie finale. Après évaporation du solvant, les particules porogènes piégées sont extraites à l'aide d'un solvant approprié à leur dissolution entraînant la formation d'une structure poreuse (**Figure 1-6b**). Ces matrices principalement à base de polyesters [183, 184] ou de protéines naturelles [185, 186] sont extrêmement poreuses et peuvent être générées avec des porosités et des tailles de pore respectivement supérieures à 90 % et 500 µm. Le principal avantage de cette méthode est sa facilité de mise en œuvre et ne nécessite pas un équipement spécifique. De plus, cette technique offre la possibilité de réaliser des architectures où la taille des pores (large choix de taille de porogènes) et la porosité (rapport polymère/porogène) sont contrôlées indépendamment. Cependant, les inconvénients sont la faible épaisseur des membranes formées, l'agglomération de porogènes qui entraîne une anisotropie des pores et l'utilisation de solvant organique.[187, 188]

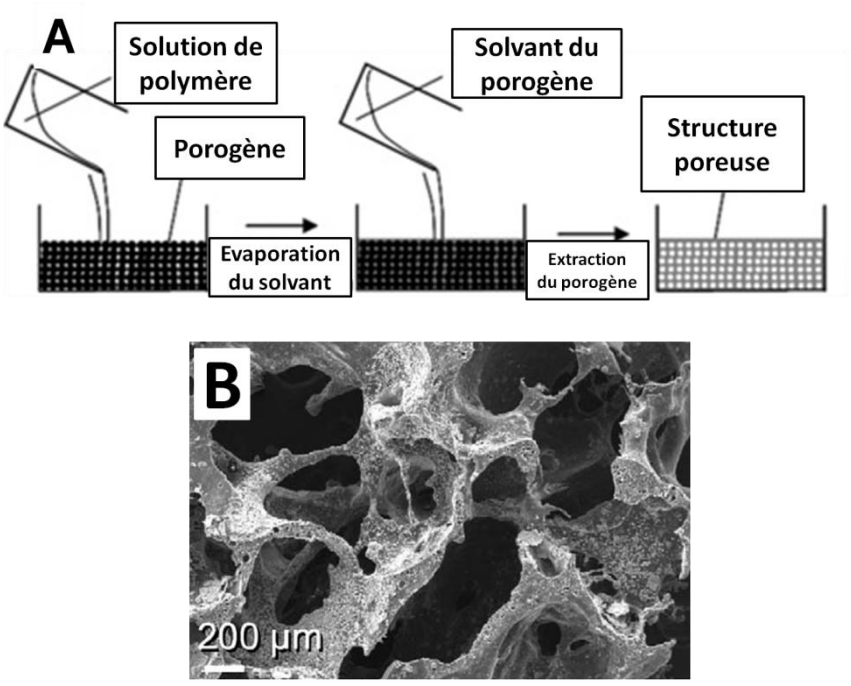


Figure 1-6 : A) Représentation schématique de la technique de l'extraction d'un agent porogène et B) Morphologie d'une mousse poreuse de polymère réalisée par l'extraction d'un agent porogène.[27]

- La lyophilisation

La lyophilisation consiste à éliminer un solvant d'abord par sublimation d'un échantillon congelé, puis par désorption du solvant non congelé sous pression réduite. Dans l'étape de congélation, la solution de polymère est refroidie jusqu'à atteindre la congélation du matériau conduisant à la formation de cristaux de glace (si le solvant est l'eau) qui oblige le polymère à s'agréger dans les espaces interstitiels. Lors de la deuxième étape, le solvant est éliminé sous une pression inférieure à l'équilibre vapeur/pression du solvant congelé. Une fois le solvant congelé, complètement sublimé, le procédé continue en chauffant légèrement l'échantillon pour obtenir un matériau sec.[189, 190] La sublimation du solvant conduit à des mousses fortement poreuses possédant une taille de pores faible.[191] La structure poreuse finale dépend des conditions utilisées comme le pH ou encore la vitesse de refroidissement. En effet, un refroidissement rapide et non contrôlé mène à la nucléation de cristaux non-uniformes entraînant une morphologie poreuse hétérogène.[192]

- La technologie des fluides supercritiques

Un fluide supercritique est généré lorsque la substance est exposée à des conditions où la température (Tc) et la pression (Pc) critiques sont dépassées. Dans cet environnement, les états gazeux et liquide des composants du matériau deviennent identiques. Le dioxyde de carbone est principalement utilisé en raison de sa faible toxicité, inflammabilité et coût ainsi que sa stabilité.[193] La porosité est créée pendant le processus de génération du fluide supercritique par l'instabilité thermodynamique qui résulte de la dépressurisation autour du polymère liquéfié.[194] Il en résulte des molécules de gaz générant des pores dans le polymère resolidifié. La morphologie poreuse de la structure peut donc être contrôlée en fixant la quantité de gaz incorporée, ainsi que son taux de libération et diffusion qui sont liés à la température et la pression appliquées (**Figure 1-7**). La technologie du CO_2 supercritique permet de fabriquer des structures fortement poreuses principalement à base de PLA [193, 195] constituées de pores pouvant atteindre 500 µm.[193, 194, 196] L'avantage de cette technique est l'absence de solvant organique qui pourrait altérer la biocompatibilité et la fonctionnalité des facteurs de croissance s'il n'est pas complètement éliminé. Néanmoins, cette technologie n'est pas parfaite : sa teneur élevée de pores non connectés et la présence d'un revêtement non poreux en surface (résultant de la rapide diffusion du gaz loin de la surface) sont certainement défavorables pour la croissance cellulaire.[193, 194]

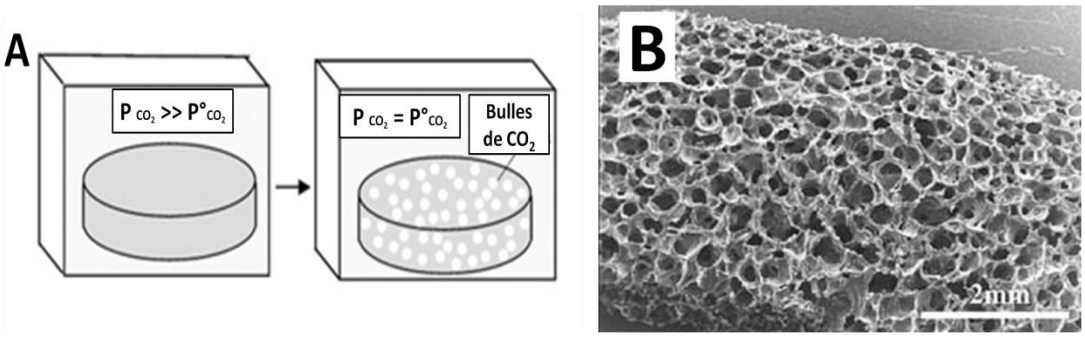


Figure 1-7 : A) Représentation schématique de la technologie des fluides supercritiques et B) Image de MEB de la morphologie d'une mousse poreuse de polymère synthétique (PLA) réalisée par la technologie des fluides supercritiques.[193]

- Génération de structures poreuses par séparation de phases induite thermiquement

Le principe de la séparation de phases consiste à établir une instabilité thermodynamique dans une solution homogène de polymère qui, dans certaines conditions,

tend à se séparer en au moins deux phases distinctes. Le polymère servant de futur support aux cellules se solidifie tandis que la seconde phase servant d'agent porogène est extraite générant ainsi une architecture polymère fortement poreuse.[197]

Actuellement, la méthodologie la plus exploitée pour l'élaboration de structures tridimensionnelles est la séparation de phases induite thermiquement (TIPS).[198] Le principe consiste à faire varier rapidement la température (en chauffant ou refroidissant) afin de conduire la solution homogène de polymère vers la région spinodale de son diagramme de phase binaire. Une fois dans cette région, la solution devient instable et se sépare spontanément en deux phases (**Figure 1-8**).[197] Les paramètres influençant la micro/macro structure sont la concentration du polymère en solution, la température atteinte ainsi que la vitesse de chauffage/refroidissement. Des matrices principalement réalisées à base de PLA possédant une porosité pouvant être supérieure à 95 % [27] sont utilisées pour diverses applications en ingénierie tissulaire (régénération osseuse ou intestinale).[198-200] Bien qu'une structure fortement poreuse et interconnectée puisse être élaborée, la gamme des tailles de pores reste limitée, tout comme le contrôle de sa micro/macro morphologie. De plus, le séchage du solvant demeure incomplet surtout pour les supports épais, entraînant de potentiels effets de cytotoxiques.[191]

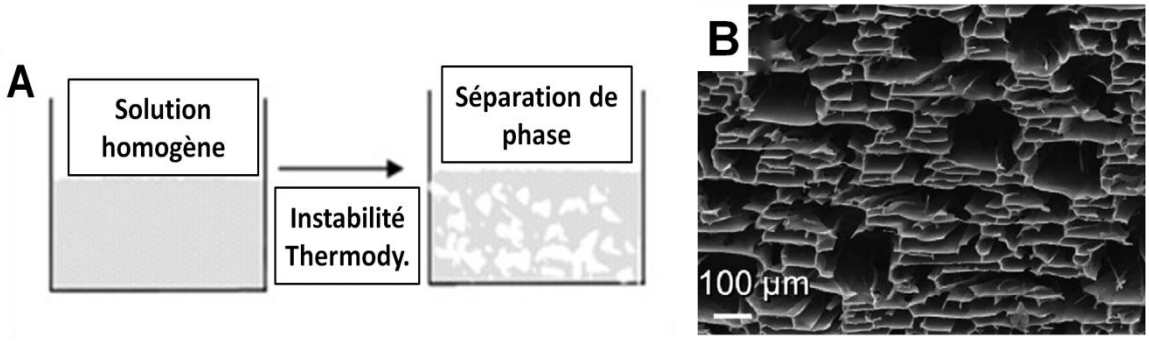


Figure 1-8: A) Représentation schématique de la technique de la séparation de phases et B) Image de MEB de la morphologie d'une mousse poreuse de polymère réalisée par la séparation de phases induite thermiquement.[27]

D'autres méthodes d'élaboration de matériaux poreux existent, telles que les techniques de moulage de polymères impliquant un chauffage au dessus de sa transition vitreuse et l'application d'une forte pression. Une autre méthode consiste à utiliser la robotique afin de produire des architectures à porosité contrôlée. Cependant ces méthodes impliquent l'utilisation

de procédés lourds et complexes, de plus, la gamme de matériaux capables d'être fabriqués par ces techniques est relativement étroite.[53]

1.1.2.2 Elaboration d'hydrogels

Les hydrogels sont des réseaux capables de gonflement en solution aqueuse adaptés à la vectorisation de cellules et d'agents bioactifs. Ces réseaux peuvent être utilisés comme dispositifs injectables car ils peuvent combler aisément des zones endommagées de toutes tailles et être implantés de manière peu invasive.[201] Les supports sous forme d'hydrogels permettent une circulation des nutriments et des déchets mais ont également la capacité de suspendre de manière homogène les cellules dans un environnement tridimensionnel. D'autre part, les hydrogels sont capables d'amortir les contraintes mécaniques, protégeant et contrôlant ainsi les forces exercées sur les cellules encapsulées de manière similaire aux conditions physiologiques. Malgré des propriétés mécaniques modulables en fonction de la densité de réticulation (pouvant compromettre la viabilité cellulaire), elles demeurent limitées et représentent un des inconvénients majeurs de l'utilisation des hydrogels.[202]

La capacité des hydrogels à être utilisés comme biomatériaux ainsi que leurs performances dans une application particulière dépendent en majeure partie de leur structure. Les paramètres les plus importants qui caractérisent la structure d'un hydrogel sont : la masse molaire entre deux nœuds de réticulation, la taille de la maille correspondante et la densité de réticulation. Ces paramètres sont liés entre eux et peuvent être déterminés par des mesures de gonflement [203] ou encore, plus récemment développé, par RMN du solide à rotation à l'angle magique (HR-MAS) où les fractions réticulables n'ayant pas réagi sont quantifiées.[204]

Les hydrogels peuvent être réticulés soit physiquement par des enchevêtrements de chaînes et/ou par des liaisons ioniques, hydrogène, des interactions hydrophobes, soit chimiquement par la formation de liaisons covalentes. D'autre part, les propriétés de gonflement dans l'eau impliquent l'utilisation de polymères hydrosolubles afin de permettre l'incorporation des molécules d'eau au sein des chaînes. Dans cette optique, les matériaux principalement utilisés sous forme d'hydrogels sont les polymères naturels précédemment détaillés pour leur forte biocompatibilité, leurs faibles propriétés mécaniques, leur caractère hydrosoluble ainsi que la présence de fonctions réactives nécessaires au processus de réticulation.[205]

De façon plus intéressante, un grand nombre de ces polymères naturels possède la faculté de s'auto-structurer en fonction de la température.[205] Deux catégories différentes de matériaux sensibles à la température peuvent être distinguées : les matériaux « upper critical

solution temperature » (UCST) et « lower critical solution temperature » (LCST), tous deux possédant un fort potentiel pour des applications dans le domaine biomédical grâce à leur capacité à former ou dissocier le gel *in-situ*. Les gels UCST forment une solution homogène au-dessus d'une température critique, en dessous un gel est généré sous l'action de liaisons hydrogène intermoléculaires thermoréversibles. Les polymères naturels possédant ces caractéristiques sont la gélatine, quelques polysaccharides comme l'agarose et l'amylose [205] mais aussi le poly(alcool vinylique) pour les polymères synthétiques.[206] De manière analogue, les gels LCST forment une solution homogène à faible température. Lorsqu'ils subissent un chauffage, les domaines hydrophobes se rassemblent pour générer l'hydrogel. A titre d'exemples pour un tel système, on peut citer les polymères branchés de polyacétal et de poly(éthylène glycol) en chaîne latérale [207] et le poly(N-isopropylacrylamide-*co*-acide méthacrylique).[208]

Par ailleurs, les principales méthodes de réticulation chimique (**Figure 1-9)** utilisent la combinaison du 1-éthyl-3-(3-diméthyl aminopropyl)carbodiimide (EDC) et du N-hydroxysuccinimide (NHS). Cette technique est utilisée pour la génération des gels à base d'acide hyaluronique[209, 210], de collagène ou de gélatine.[211] D'autres méthodes de réticulation appliquées à l'acide hyaluronique consistent en sa fonctionnalisation avec une fonction méthacrylate permettant une réticulation photo-amorcée [212, 213] ou encore par des fonctions thiol qui seront couplées avec un poly(éthylène glycol) fonctionnalisé avec des fonctions acrylate par réaction de Michaël.[214] En outre, le glutaraldéhyde [215], certains diisocyanates [216] ou la génipine [217] sont également utilisés afin de générer des hydrogels à base de protéines de la MEC comme cela a été précédemment décrit pour le collagène ou la gélatine. Les diverses applications en ingénierie tissulaire allant de la vectorisation de facteurs de croissance jusqu'au traitement de tissus osseux sont répertoriés par Van Vlieberghe *et al*.[205] Bien que les propriétés biologiques de ces supports soient excellentes, il est nécessaire pour certaines applications de coupler les protéines ou les polysaccharides avec des polymères synthétiques tels que la PCL [205], le PLA [218] ou le PLGA [219] afin d'améliorer leurs propriétés mécaniques.

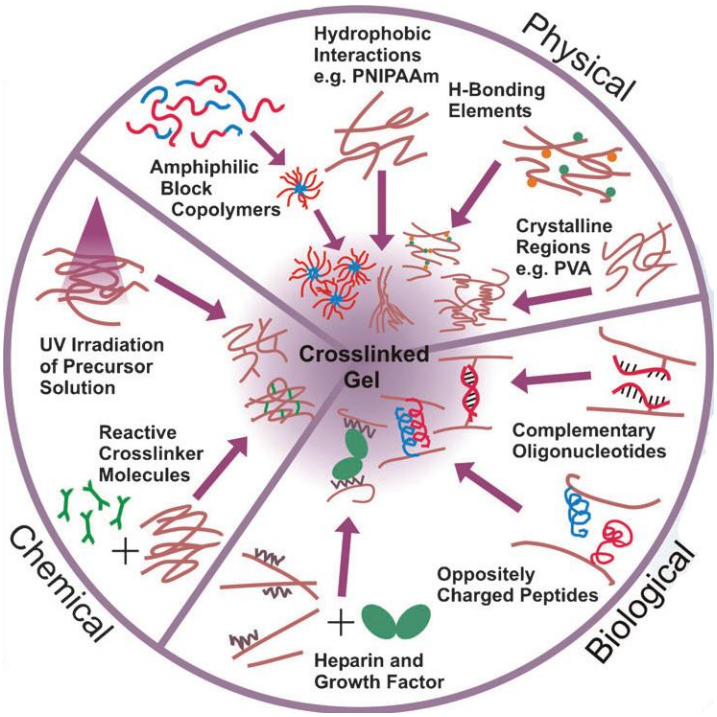


Figure 1-9: Les différentes méthodes de réticulation au sein d'un hydrogel. Les hydrogels chimiques consistent en la création de liaisons covalentes permanentes entre chaînes par irradiation UV et/ou par l'utilisation de fonctions réactives. Les hydrogels physiques sont formés de liaisons réversibles.[121]

1.1.2.3 Elaboration de structures fibreuses

Les stratégies d'ingénierie tissulaire utilisant des structures fibreuses représentent un axe particulièrement attractif car celles-ci adoptent la même morphologie que la MEC et sont capables de mimer son rôle de support. De manière similaire à celles la MEC, les fibres des matrices réalisées peuvent subir des contraintes mécaniques, supporter la croissance cellulaire, et agir comme des réservoirs pour la délivrance de molécules bioactives. D'autre part, dans diverses stratégies de régénération osseuse, une matrice fibreuse est utilisée comme modèle pour la minéralisation de manière similaire aux fibres de collagène de la MEC. Les architectures fabriquées forment une structure mimant celle des os et fournissent un microenvironnement propice aux fonctions ostéogéniques des cellules en développement.[220]

Le « wet-spinning » est une technique de séparation de phases induite par un non-solvant permettant la production de microfibres de polymère par précipitation. Plus précisément, une fibre de polymère continue est produite par la précipitation d'un filament d'une solution de polymère dans un non-solvant. Le filament homogène constitué de polymère,

de solvant et potentiellement d'additifs se solidifie par désolvatation du polymère induite par les échanges solvant/non-solvant. Ces dernières années, différentes structures poreuses/fibreuses tridimensionnelles générées par « wet-spinning » à partir de plusieurs polymères comme le chitosane[221], la PCL[222] ou le PLA[223] ont été proposées comme support pour l'ingénierie tissulaire.

Durant ces 10 dernières années, la technique de l' « electrospinning » a été largement employée comme méthode de fabrication de structures poreuses avec des fibres aux dimensions flexibles allant de l'échelle micrométrique jusqu'à l'échelle nanométrique.[224, 225] De plus, les architectures fabriquées présentent une morphologie tout à fait similaire à celle des fibres de collagène présentes dans la MEC. Cette analogie structurelle, capable de mimer l'organisation et les fonctions biologiques de la MEC, constitue un atout majeur pour l'élaboration d'une matrice capable de générer des interactions avec les cellules et sur laquelle différentes fonctionnalités peuvent également être incorporées.[226] Cette technique économique, souple, transposable à grande échelle, reproductible et particulièrement flexible dans le choix des matériaux utilisés mais aussi dans le contrôle de la géométrie de la structure tend à s'imposer comme le moyen le mieux adapté pour l'élaboration de supports destinés à la régénération tissulaire.[225, 226] Les applications semblent illimitées puisque les structures peuvent être modulées pour mimer la structure tissulaire humaine, avec des besoins applicatifs particuliers comme l'os, le cartilage et le système vasculaire. Le principe consiste à appliquer un champ électrostatique fort à une seringue contenant une solution concentrée en polymère. Sous l'action de ce champ, un jet très fin est éjecté et accéléré en sortie de seringue puis est déposé sur un collecteur relié à la terre (ou chargé à un voltage opposé) (**Figure 1-10**). La forte instabilité subie par le jet entraîne son étirement, et simultanément l'évaporation du solvant, conduisant au dépôt de fibres sèches et solides sur le collecteur.[224, 225] Les structures fibreuses ainsi réalisées offrent une porosité et une surface spécifique élevées favorables à l'attachement des cellules.[227] Une grande variété de macromolécules naturelles telles que le collagène,[228] la gélatine[229] ou encore le chitosane[230, 231] ainsi que des polymères synthétiques comme le PLGA,[232] le PLA[233] ou la PCL[234] a été mise sous forme de fibres non-tissées pour diverses applications en ingénierie tissulaire.[235] D'autre part, la prolifération et la différentiation de différents types cellulaires ont également été rapportées, révélant la capacité de ces dispositifs à supporter le développement cellulaire et la formation de nouveaux tissus.[149,228,235-238] A titre d'exemple, la différentiation ostéogénique de cellules souches embryonnaires étudiée sur plusieurs architectures fabriquées par différentes techniques (TIPS, évaporation de solvant, etc.…) a démontré une minéralisation trois fois plus grande pour les cellules en développement sur une matrice nanofibreuse après 4 semaines de culture.[233]

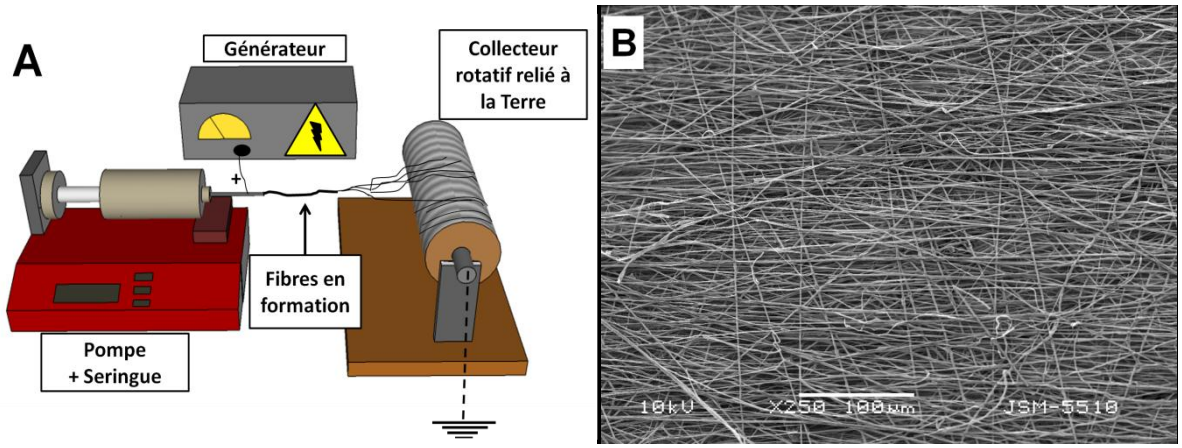


Figure 1-10 : **A) Représentation schématique d'un dispositif d'« electrospinning » et B) Image de MEB de la morphologie d'une architecture poreuse fibreuse de polymère synthétique réalisée par « electrospinning ».**

1.2. Le procédé d' « electrospinning »

La technique de l'« electrospinning », également appelée « electostatic spinning » (électrofilage en français), repose sur des principes connus depuis bien longtemps. En 1882, Lord Rayleigh a travaillé sur le nombre de charges nécessaires afin de surmonter les forces de tension de surface d'une goutte.[239] Par la suite, les premiers dispositifs générant un spray à partir de liquide par l'application de charges électrostatiques ont été brevetés par Cooley et Morton en 1902 et 1903.[240, 241] Le premier brevet décrivant réellement un dispositif capable de générer des fibres synthétiques par l'application de charges électrostatiques est apparu en 1934 et a été déposé par Anton Formhals de l'université de Mayence.[242] Malgré ces premières découvertes, le procédé n'a été utilisé commercialement qu'à partir de 1991 pour la fabrication de filtres dans le cadre de l'industrie textile.[243]

Depuis les années 1990, l'« electrospinning » suscite de plus en plus d'intérêts dans le secteur industriel mais aussi académique, notamment grâce au groupe de Reneker de l'université d'Akron qui a développé la fabrication de fibres très fines à partir de polymères organiques.[244, 245] Une des raisons du fort développement de cette technique est la combinaison de la recherche fondamentale et appliquée provenant de différentes disciplines des sciences et de l'ingénierie.[246] Ces efforts de recherche, ciblant en général des systèmes fonctionnels et complexes sont porteurs d'intérêts particuliers.[246] En effet, ils peuvent être certainement appliqués à l'échelle industrielle et les dispositifs fibreux où les propriétés macroscopiques (combinant la chimie, la physique et la biologie) peuvent être soumises à des modifications au

niveau moléculaire. La capacité à fabriquer des fibres de manière constante, allant de quelques nanomètres à plusieurs microns (**Figure 1-11**) demeure également un avantage compte tenu de la difficulté à atteindre des tailles submicroniques par l'utilisation d'autres techniques de filage de fibres.[247, 248]

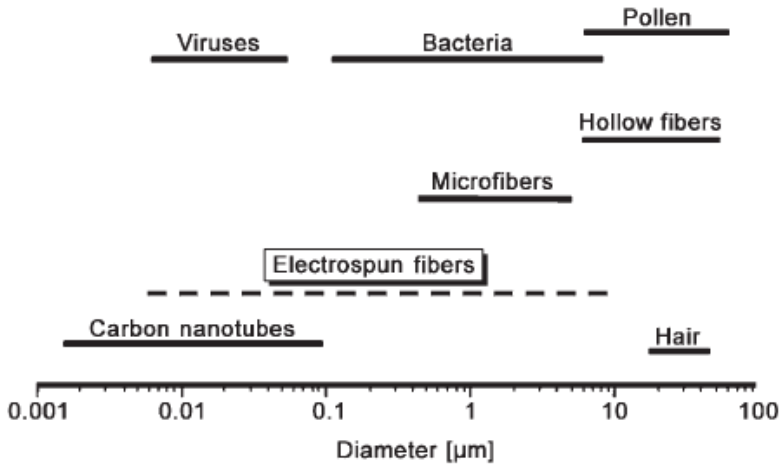


Figure 1-11 : Comparaison de la gamme des diamètres de fibres réalisables par « electrospinning » avec d'autres structures biologiques et technologiques. [246]

La surface spécifique importante ainsi que l'élaboration de fibres régulières par « electrospinning » offrent d'intéressantes perspectives d'applications englobant une multitude de concepts nouveaux dans divers secteurs tels que la nanocatalyse, la filtration, la fabrication de nouveaux tissus pour les vêtements, l'optoélectronique, l'énergie ou dans le secteur biomédical avec notamment l'élaboration de structures pour l'ingénierie tissulaire, de pansements et la libération de principes actifs.[225, 246, 247, 249] Le développement rapide de cette technique est illustré par la **Figure 1-12** représentant le nombre de publications scientifiques par an où l'« electrospinning » est illustré (**Figure 1-12A**) et où son utilisation est rapportée à l'élaboration de structures pour l'ingénierie tissulaire qui est un domaine en pleine expansion (**Figure 1-12B**).

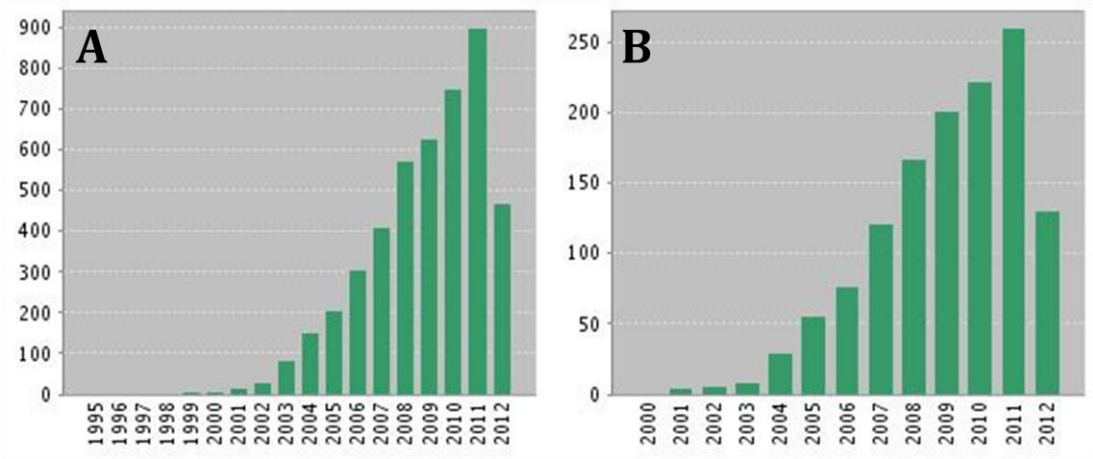


Figure 1-12 : Graphiques reflétant le nombre de publications par an indexées dans Web of Science® pour les mots clés : A) electrospinning B) electrospinning, tissue engineering.

La grande surface spécifique des architectures tissulaires élaborées par « electrospinning » favorise l'adsorption des protéines et présente davantage de sites d'ancrage pour les récepteurs de la membrane cellulaire.[250] L'utilisation de l'« electrospinning » dans le domaine de la régénération tissulaire est centrée majoritairement sur deux axes :

- La formation d'une matrice à partir de différents biomatériaux adaptés (biodégradable, biocompatible, propriétés mécaniques) dans le but de mimer les dimensions physiques de la MEC (géométriques et morphologiques), de supporter l'organisation, la prolifération et la différentiation cellulaire mais aussi d'assurer la formation d'un nouveau tissu fonctionnel.
- L'optimisation de l'équipement d'« electrospinning » pour s'approcher au plus près des caractéristiques de la MEC et ainsi fournir un support favorisant la prolifération, le développement et la différentiation cellulaires.

1.2.1. Dispositifs mis en œuvre

La formation des fibres est imputable à l'application d'un champ électrostatique fort à une solution concentrée de polymère. Les éléments indispensables pour réaliser une matrice fibreuse sont : un générateur à haute tension générant dans la majorité des études un courant continu, une pompe, une seringue avec une aiguille en métal et un collecteur relié à la terre (**Figure 1-10**).

Le dispositif peut être modulé dans le but de développer divers types d'architectures aux fonctionnalités différentes. A titre d'exemple, certaines équipes de recherche ont réalisé des

structures en utilisant plusieurs seringues disposées dans un alignement parallèle permettant la fabrication d'un matériau fibreux constitué de plusieurs types de polymères aux propriétés complémentaires (**Figure 1-13**).[251, 252] D'autre part, ce procédé peut également être utilisé afin de réaliser une matrice de grandes dimensions. L' « electrospinning » à partir de plusieurs jets est autrement plus compliqué que le procédé classique en raison des phénomènes de répulsion générés par les jets chargés à l'identique.[246]

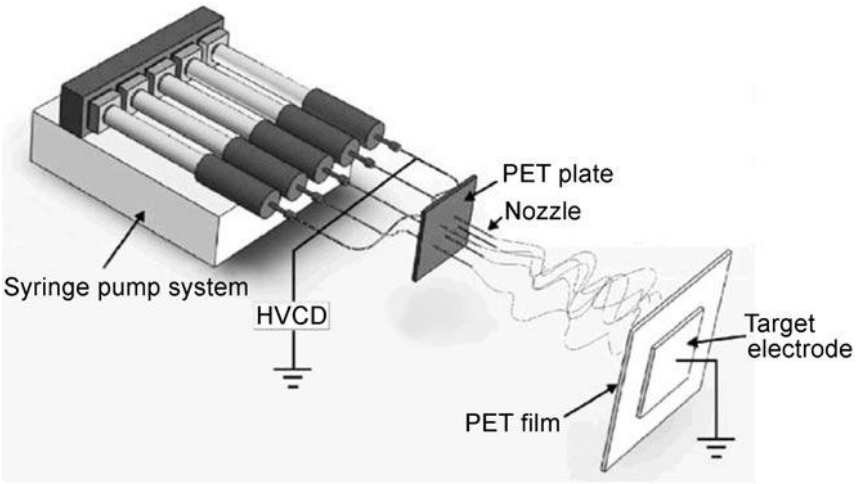


Figure 1-13 : Dispositif expérimental d' « electrospinning » à partir de plusieurs seringues[251]

L'intégration au sein des fibres de molécules fonctionnelles (surtout dans le domaine biomédical) constitue un verrou technologique. En effet, la nécessité de conserver l'agent (biomolécules, protéines, enzymes, etc.) dans un milieu aqueux pour préserver son activité et/ou la faible masse des biomolécules empêchent la structuration de la solution sous forme de fibres. Ces obstacles ont été surmontés grâce à un procédé d' « electrospinning » coaxial.[253-256] Dans ce procédé, deux aiguilles ou canules sont alignées concentriquement (**Figure 1-14A et B**) et soumises au même voltage. Un jet est alors généré et, dans les meilleurs des cas, une nanofibre de structure cœur-couronne est formée. En général, le procédé implique deux solutions visqueuses et non miscibles qui sont éjectées simultanément par des capillaires situés l'un dans l'autre, formant ainsi une goutte enveloppant une autre (**Figure 1-14C**). Un problème est régulièrement rencontré pendant la formation des fibres. Lorsque la goutte externe se transforme en jet, la goutte interne reste stable à cause de l'absence de charge en surface. La déformation de la goutte interne en cœur de fibres est essentiellement due à la viscosité.

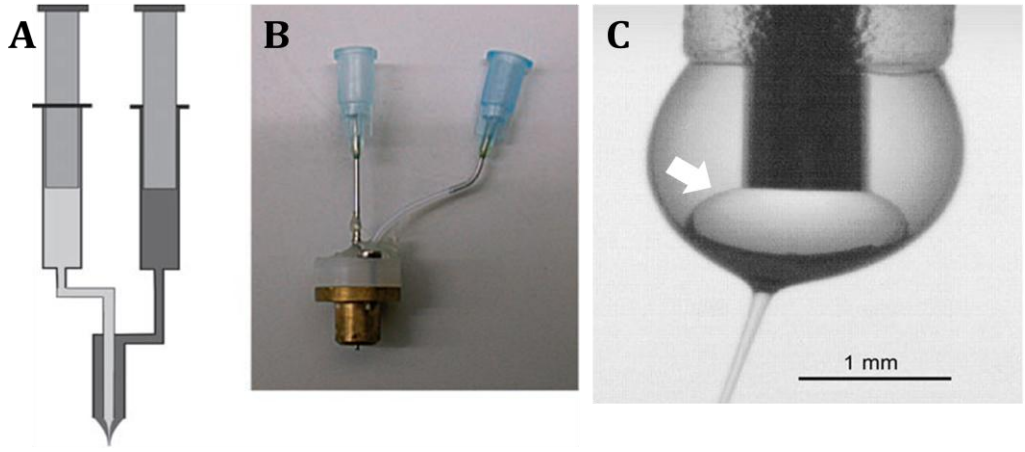


Figure 1-14 : A) Représentation schématique d'une aiguille coaxiale. B) Dispositif expérimental d'aiguille coaxiale réalisé par le groupe de Greiner et Wendorff. C) Image de microscopie optique d'une goutte cœur-couronne issue d'une aiguille d'un dispositif d' « electrospinning » coaxial.[246]

1.2.2. Principe de la technique

Bien que le dispositif d « 'electrospinning » soit plutôt simple, le mécanisme de filage est légèrement plus compliqué. Lorsqu'une haute tension est appliquée en sortie d'aiguille sur une goutte d'une solution concentrée en polymère, il y a création de charges qui perturbent la surface et conduisent à la déformation de la solution qui prend la forme d'un cône appelé cône de Taylor (**Figure 1-15A**). La goutte subit alors deux types de force électrostatique : les forces de répulsion entre les charges en surface et la force coulombienne exercée par le champ électrostatique externe.[245, 248] **Les Figures 1-15B** et **C** représentent respectivement une goutte avant et après l'application du voltage et révèlent la déformation du liquide mais aussi la formation d'un jet dû aux forces électrostatiques supérieures aux forces de tension de surface de la solution de polymère. Simultanément à l'élongation du jet et à l'évaporation du solvant, son diamètre se réduit considérablement de centaines de micromètres à, dans certains cas, quelques dizaines de nanomètres.

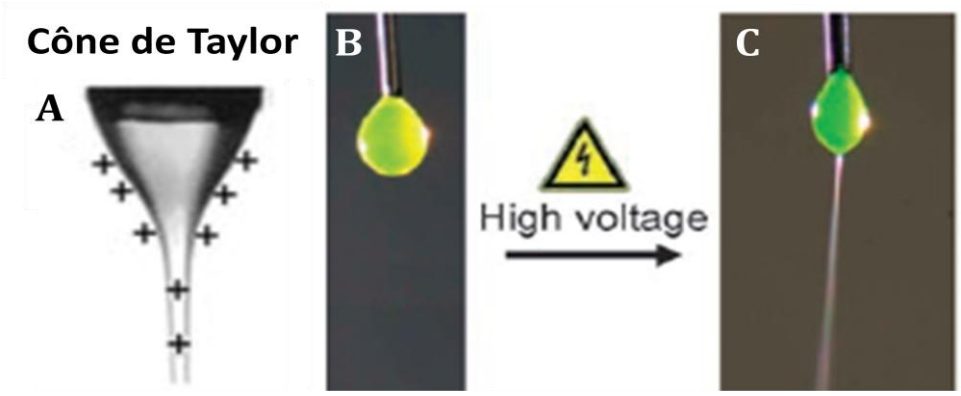


Figure 1-15 A) Représentation schématique du cône de Taylor formé par une solution chargée.[225] Une goutte d'une solution aqueuse de poly(oxyde d'éthylène) (PEO) colorée à la fluorescéine : A) Sans l'application d'un voltage, B) Sous l'application d'un voltage de 20 kV avec un collecteur placé perpendiculairement au jet.[246]

Après des observations plus précises, il devient évident que le procédé d' « electrospinning » est très complexe. A titre d'exemple, diverses études ont démontré que le rétrécissement du diamètre du jet est principalement causé par l'instabilité associée à la forte charge électrique qu'il subit. [248, 257] Il est possible de discerner sur la **Figure 1-16A** que le jet est initialement droit puis devient instable générant de multiples jets dans la zone d'instabilité. Cependant, grâce à une observation plus précise par une caméra capable de photographier avec des temps de capture extrêmement faibles (**Figure 1-16B**), il devient possible de montrer que l'enveloppe conique générée est composée d'un unique jet extrêmement flexible et instable. La fréquence de vibration est tellement élevée qu'une photographie conventionnelle est inadaptée pour observer correctement le processus de filage, car elle donne l'impression que le jet se divise en plusieurs branches lorsqu'il se dirige vers le collecteur. Des explications plus approfondies à l'aide de modèles mathématiques et électrohydrodynamiques ont été proposées par le groupe de Reneker.[248,257]

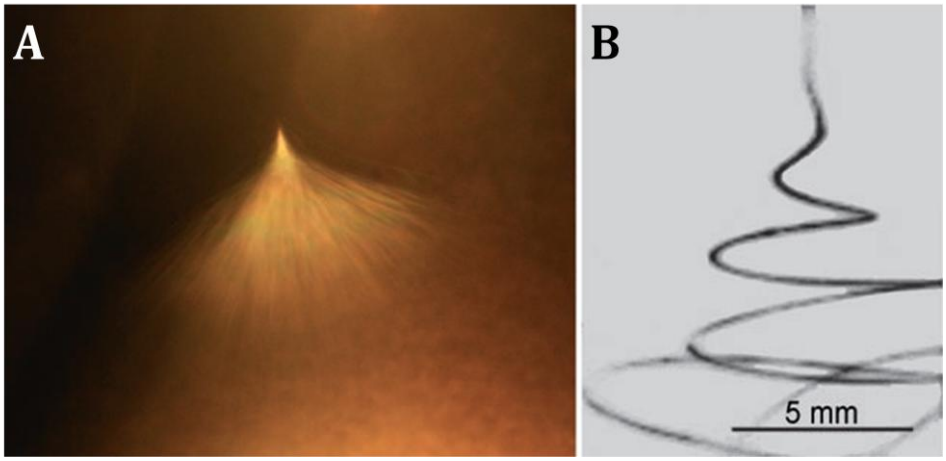


Figure 1-16 : Photographies illustrant l'instabilité du jet liquide d'une solution aqueuse de PEO durant une expérience d' « electrospinning ». A) Photographie conventionnelle et B) Photographie à haute vitesse des instabilités du jet.[257]

1.2.3. Paramètres modulables

La plupart des polymères solubles peuvent être mis en œuvre sous forme de fibres à condition que leurs propriétés physiques (solubilité, masse molaire, température de transition vitreuse et de fusion, etc.) soient adaptées et que les paramètres physico-chimiques (concentration de la solution, voltage, solvant, etc.) soient correctement ajustés. Dans cette optique, une connaissance empirique est primordiale, cependant comme expliqué précédemment, l'application de modèles théoriques peut également aider à prévoir les dimensions et la structure des fibres obtenues par « electrospinning ». Les paramètres majeurs et leur influence sur la morphologie des fibres sont résumés dans le **Tableau 1-4**.

Tableau 1-4 : Effets des paramètres d' « electrospinning » sur la morphologie des fibres

Paramètres		Effet sur la morphologie des fibres	
Voltage appliqué (entre 15 kV et 30 kV)	↑	Diamètre des fibres	↓
Débit (entre 0,5 et 3 $mL.h^{-1}$)	↑	Diamètre des fibres	↑
Distance aiguille/collecteur (entre 15 et 25 cm)	↑	Diamètre des fibres	↓
Concentration en polymère (viscosité) (entre 1 % et 30 % (m/v) dépend de la masse molaire du polymère)	↑	Diamètre des fibres	↑

Conductivité de la solution	↑	Diamètre des fibres	↓
Volatilité du solvant	↑	Génération de pores en surface des fibres	

1.2.3.1 La solution de polymère

La viscosité joue un rôle déterminant dans le contrôle de la morphologie d'un matériau nanofibreux. Il a été montré qu'une viscosité optimale est requise, car une viscosité trop faible rend impossible la formation de fibres continues alors qu'une viscosité élevée conduit à des difficultés lors de l'éjection du jet hors de la seringue.[258, 259] La concentration en polymère ainsi que sa masse molaire (devant être en général supérieure à 70 000 $g.mol^{-1}$) sont des paramètres qui permettent de contrôler la viscosité. La concentration en polymère détermine la capacité à générer des fibres à partir d'un liquide. En effet, la concentration en macromolécules doit être suffisamment grande pour assurer un enchevêtrement inter-chaînes. Une solution trop diluée conduit à une rupture des fibres avant qu'elles n'atteignent le collecteur à cause des effets de tension de surface et de la faible densité en enchevêtrements. Au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration en polymère, les fibres générées présentent des défauts sous forme de « perles » (**Figure 1-17A**), puis la forme sphérique de ces défauts s'allonge pour former des fuseaux, et enfin des fibres uniformes avec un diamètre augmentant en raison de la résistance de la viscosité.[260] Shenoy *et al.* [258] ont présenté un modèle qui permet le calcul du nombre d'enchevêtrements en solution, $(n_e)_{soln}$, afin de prédire la morphologie des fibres pour divers polymères. La **Figure 1-17B** illustre la relation entre le nombre d'enchevêtrements en solution et la morphologie des fibres de polystyrène (PS) de différentes masses molaires en fonction de la concentration en solution. Au delà d'un nombre d'enchevêtrements de 3,5 les fibres ont une structure uniforme. D'autre part, il est intéressant de remarquer que plus la masse molaire est faible, plus il est nécessaire de concentrer la solution pour atteindre une valeur minimale de $(n_e)_{soln}$, ce qui démontre bien l'importance majeure de ces paramètres sur la morphologie des fibres.

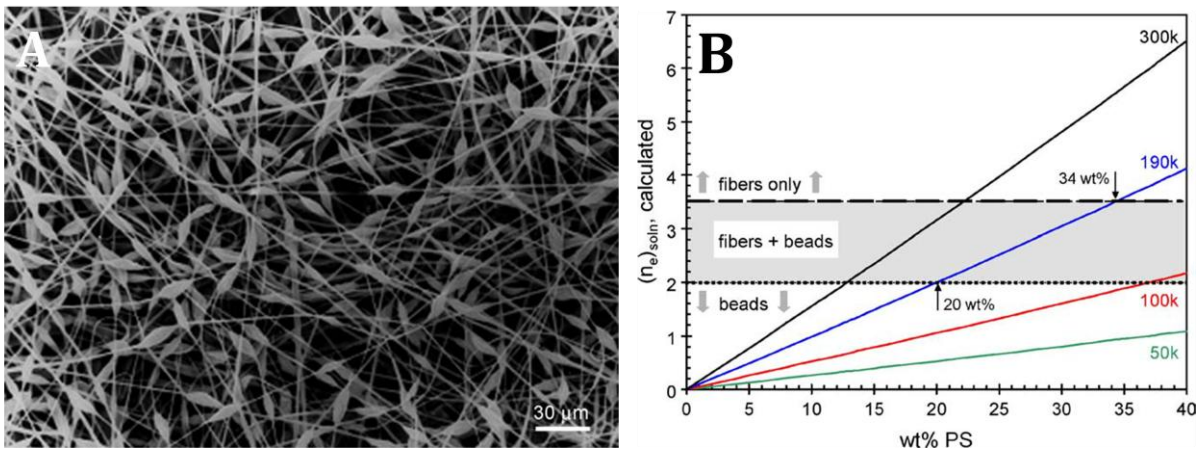


Figure 1-17 : A) Image de MEB de fibres de PS présentant des défauts sous forme de perles. B) Courbes représentant $(n_e)_{soln}$ en fonction de la concentration en solution de PS de différentes masses molaires. Les lignes en pointillés représentent les changements morphologiques des fibres.[258]

Le nature du solvant est également très importante dans l'optique de produire des fibres mais aussi de moduler leur porosité. Pour assurer une évaporation suffisante du solvant pendant le trajet du jet entre l'aiguille et le collecteur, un solvant volatil doit être utilisé. La capacité du solvant à s'évaporer contrôle la séparation de phases indispensable à la déposition des fibres de polymère solides. D'autre part, Megelski *et al.*[261] ont mis en évidence les différences de topologie de surface de fibres de PS élaborées dans du tetrahydrofurane (THF, très volatil) et dans du diméthylformamide (DMF, très peu volatil). L'évaporation rapide du solvant conduit à la formation de pores en surface (**Figure 1-18A**) tandis que les fibres fabriquées à partir d'une solution de DMF présentent une surface lisse (**Figure 1-18B**).

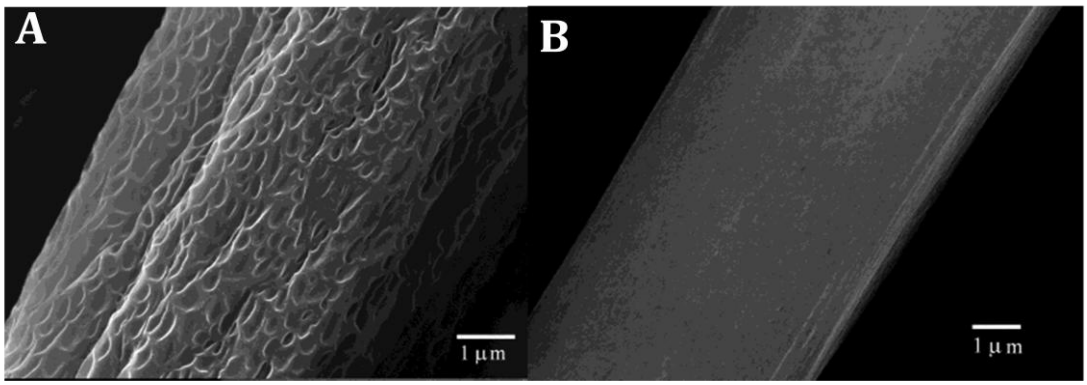


Figure 1-18 : Images de MEB de fibres de PS fabriquées à partir d'une solution de A) THF/DMF (75/25, v/v) et B) DMF (100%).[261]

La conductivité de la solution est aussi un paramètre primordial capable d'influencer significativement le diamètre des fibres.[247, 259] Les solutions très conductrices ont une plus grande capacité à transporter les charges. En effet, le jet issu d'une solution conductrice répondra plus aux forces d'étirement générées par le champ électrostatique qu'une solution peu conductrice. Ici encore, le choix du solvant est crucial puisqu'il permet le transport des ions en solution. Les solvants possédant une constante diélectrique élevée sont donc des composés de choix pour élaborer des matériaux par « electrospinning » car les forces électrostatiques créées permettront de surpasser les forces de tension de surface. Par conséquent, pour les solutions faiblement conductrices, il sera nécessaire de préparer des solutions très concentrées en polymère afin que la viscosité compense ce déficit. Lin *et al.*[262] ont démontré que l'addition d'ions affecte la morphologie et le diamètre des fibres. Cette approche permettant d'augmenter la conductivité par addition de différents sels a également été rapportée dans plusieurs travaux[247, 259] pour générer des fibres uniformes et sans défaut.

1.2.3.2 Les paramètres du dispositif expérimental

L'application d'un champ électrostatique contrôle la formation de fibres. En effet, la génération de fibres survient lorsque le voltage atteint un certain seuil, grâce à l'induction des charges nécessaires à la solution et aux forces électrostatiques initiant le procédé d' « electrospinning ». Il y a une légère controverse qui persiste par rapport au véritable effet du voltage sur la morphologie du matériau. D'après Reneker *et al.*[245], son effet sur le diamètre des fibres est très limité voire absent ; cependant d'autres équipes de recherche ont établi qu'un fort voltage facilite l'éjection du jet et forme, par conséquent, des fibres de diamètre plus grand.[263] Néanmoins, la majorité des résultats rapportés montre que l'augmentation du champ électrique conduit à l'augmentation des forces répulsives du fluide générant ainsi des fibres de diamètre plus faible.[247, 260, 261] Il est important de noter qu'un voltage trop important peut mener à la formation de défauts sur les fibres en raison d'une trop grande instabilité du jet et entraîner sa rupture.[264]

Le débit de la solution a également un impact sur le diamètre des fibres ainsi que sur leur morphologie (porosité notamment). En effet, ce paramètre influence la vitesse du jet et donc le taux de transfert du polymère. Par conséquent, un faible débit est mieux adapté car il permet une évaporation du solvant bien qu'un débit minimum soit nécessaire pour surmonter les forces de tension de surface et fournir suffisamment d'enchevêtrements des chaînes pour former une fibre.[247, 260] Pour du PS, il a été observé que le diamètre des fibres augmente lors de l'augmentation du débit. De plus, la topologie de surface peut être également légèrement

influencée.[261] Par ailleurs, un débit rapide génère des défauts sous forme de perles ou encore de fibres aplaties et collées entre elles en raison de l'incapacité du solvant à s'évaporer correctement avant d'atteindre le collecteur.[247, 261, 265]

Bien que la distance aiguille/collecteur joue un rôle moins important, ce paramètre peut influencer le diamètre et la morphologie des fibres. Il a été démontré qu'une distance minimum est nécessaire pour permettre au solvant de s'évaporer convenablement avant d'atteindre le collecteur. Une distance trop courte ou trop longue conduit à la formation de plusieurs types de défauts.[247, 261, 266] D'autre part, Doshi et Reneker ont établi que le diamètre des fibres diminue avec l'augmentation de la distance entre le cône de Taylor et le collecteur.[267]

1.2.3.3 Les paramètres ambiants

Les paramètres ambiants tels que l'humidité ou la température peuvent aussi affecter le procédé d' « electrospinnning ». En effet, la température joue un rôle sur l'évaporation du solvant mais aussi sur la viscosité de la solution entraînant pour de hautes températures la formation de fibres au diamètre plus faible. D'autre part, une forte humidité limite l'évaporation du solvant [247] ou encore selon Li *et al.*[225] peut être responsable de la décharge des fibres de polymère.

1.3. Fonctionnalisation des fibres

En général, les structures à base de polymères synthétiques sont plus facilement mises en œuvre par « electrosipinning » que celles à base de polymères naturels ; de plus, elles offrent des morphologies mieux contrôlées ainsi que des propriétés mécaniques mieux adaptées pour leur utilisation comme matrice permettant le transport de cellules et la néoformation d'un tissu.[220] Dans une approche d'ingénierie tissulaire, le matériau ainsi réalisé doit être capable de reproduire artificiellement l'environnement extracellulaire. De manière à améliorer la biocompatibilité des surfaces et *in-fine* accroître l'intégration du matériau *in vivo*, différentes approches ont été développées. Elles consistent généralement à associer un polymère biocompatible à des molécules biologiques dont l'action sur les cellules est connue. Les différentes approches sont illustrées sur la **Figure 1-19.** Plusieurs (macro)molécules naturelles (peptides, protéines, facteur de croissance,…) ont été introduites au sein des architectures élaborées sans compromettre leur efficacité.[268] Afin de répondre à ce cahier des charges, les

paragraphes suivants présenteront l'intérêt biologique de la fonctionnalisation par l'introduction de fonctions chimiques réactives ou l'association de biomolécules spécifiques, ainsi que les différentes méthodes développées. Nous limiterons notre étude aux polyesters biodégradables qui sont généralement hydrophobes et dépourvus de fonctions réactives à la différence des polyacrylates et méthacrylates qui présentent des groupements mobilisables mais sont peu dégradables.

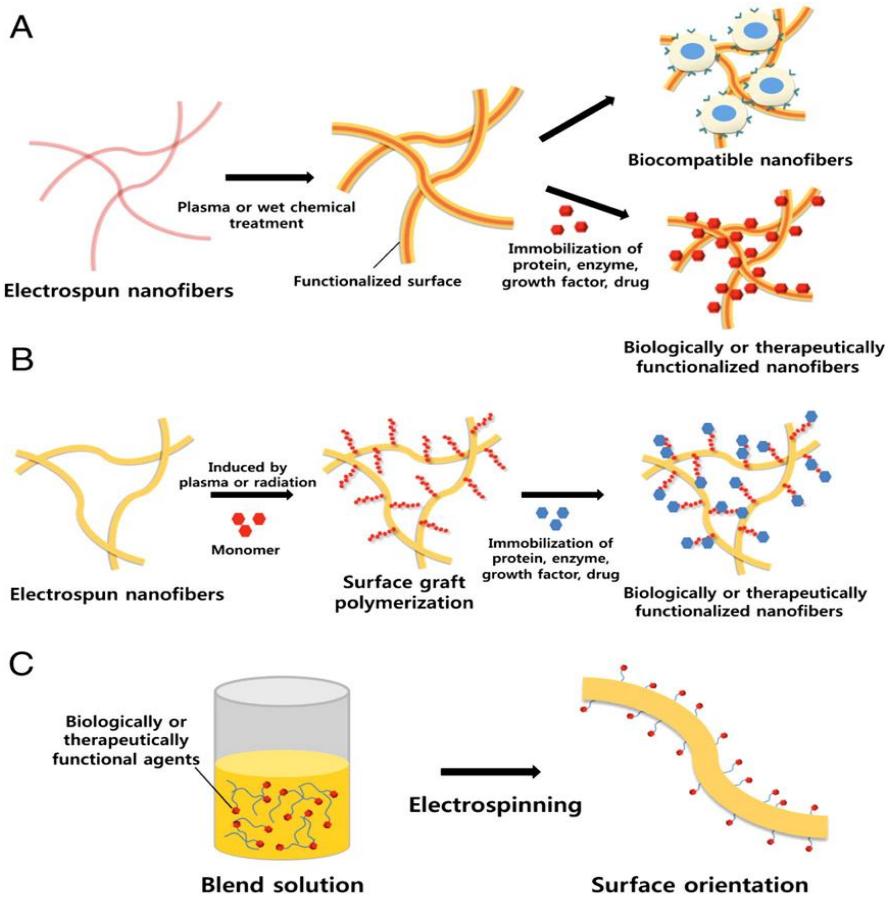


Figure 1-19 : Principales techniques de modification de surface des nanofibres A) traitement par plasma ou par des méthodes chimiques B) polymérisation par « grafting from » C) Co-electrospinning.[269]

1.3.1. Introduction de groupements fonctionnels

L'efficacité d'adsorption physique sur des fibres hydrophobes peut être significativement améliorée par différents traitements capables de rendre la surface plus hydrophile, permettant ainsi une meilleure infiltration des solutions aqueuses contenant les agents biologiques. De plus, les fonctions générées peuvent également être mobilisées pour effectuer diverses réactions de

couplage mais aussi de complexation des biocéramiques notamment grâce aux effets chélatants des acides carboxyliques vis-à-vis des ions calcium.[270, 271]

1.3.1.1 Le traitement par plasma

Le traitement par plasma de supports polymères est communément employé pour façonner les propriétés de surface, en modifiant sa composition, et par conséquent la balance hydrophile/hydrophobe.[272] Une sélection appropriée de la source du plasma offre la possibilité d'introduire différents groupements fonctionnels favorisant la biocompatibilité, ou encore de permettre un couplage covalent avec des molécules bioactives.[273] Les traitements par plasma classiquement utilisés sont à base d'oxygène, d'azote ou d'air pour générer des fonctions acide carboxylique ou amine. Une variété de protéines peut alors recouvrir la structure et se lier plus facilement à la surface des fibres et ainsi améliorer la réponse cellulaire grâce à leurs fonctionnalités.[22, 269, 274] D'autre part, Yang *et al.*[271] ont démontré la potentialité de cette technique pour la régénération osseuse en révélant une meilleure adsorption des particules de biocéramiques.[270, 271] Pour des applications de régénération osseuse, la présence de fonctions acide carboxylique en surface de fibres de PCL améliore la minéralisation de minéraux phosphocalcique lorsqu'elles sont immergées dans une solution de fluide biologique simulé.[271]

1.3.1.2 Les traitements chimiques

L'hydrolyse partielle de la surface de polyesters aliphatiques biodégradables sous forme de films ou de matrices fibreuses dans des conditions acides ou basiques a été largement utilisée pour modifier les propriétés de surface hydrophile/hydrophobe ou encore pour générer de nouvelles fonctionnalités.[269,275] Le principe consiste en la scission chimique aléatoire des liaisons ester des chaînes polymères situées sur l'extrême surface, conduisant à la formation de fonctions alcool et acide carboxylique au niveau des fragments partiellement dégradés mais qui restent toujours insolubles en solution aqueuse. Croll *et al.*[276] ont démontré que les traitements chimiques offrent une meilleure efficacité de modification de surface des échantillons fibreux épais par rapport au traitement par plasma en raison de la pénétration limitée du gaz ionisé dans l'échantillon ne modifiant pas la surface des fibres situées au cœur du matériau. Néanmoins, le traitement chimique de matrices fibreuses à base de polyester doit être réalisé avec précautions du fait de la surface spécifique élevée et des cinétiques de dégradation rapide pouvant conduire à un effondrement de la structure. Par conséquent, la durée d'hydrolyse ainsi que la concentration des réactifs sont des paramètres à optimiser de manière très précise afin de

fonctionnaliser le matériau tout en préservant ses propriétés physiques. Le traitement chimique de fibres de polyester par une diamine permet de générer des fonctions amine contribuant à améliorer l'hydrophilie de la surface mais peuvent être également mobilisables pour des réactions de couplage de molécules biologiques.[277,278] D'autre part, la génération d'acides carboxyliques en surface a été réalisée sur des matériaux fibreux à base de PLA grâce à un traitement avec de la soude. Ces fonctions sont mobilisables chimiquement mais peuvent également chélater les ions calcium et phosphate induisant la formation de nodules de minéralisation en surface pour des matériaux destinés à des applications orthopédiques.[269,279]

1.3.1.3 La technique du « grafting from »

L'introduction de nouvelles propriétés de surface mais aussi de groupements multifonctionnels peut être conférée par la technique du « grafting-from ». Cette méthode, employée principalement pour modifier les polyoléfines, est souvent amorcée avec un traitement par plasma ou par irradiation UV générant des centres actifs de type radicalaire.[269,280] Dans le cas des polyesters biodégradables, cette technique a été utilisée sur le PLA, le PGA et le PLGA avec la polymérisation de monomères d'acide acrylique générant ainsi des fonctions acide carboxylique capables de favoriser le développement de fibroblastes.[281] D'autre part, bien que le poly(éthylène téréphtalate) ne soit pas un polyester biodégradable, le greffage de monomères d'acide méthacrylique amorcé par le Ce(IV) à la surface de fibres prétraitées au formaldéhyde a également été rapporté. Les fonctions acide carboxylique en surface auront ensuite pour rôle d'immobiliser la gélatine afin de favoriser la prolifération de cellules endothéliales. [282]

1.3.2. Association de biomolécules

1.3.2.1 Adsorption physique de molécules biologiques

La méthode la plus simple pour biofonctionnaliser la surface des fibres avec certains agents biologiques consiste en l'immersion de la structure fibreuse, dans des solutions contenant les biomolécules solubilisées permettant leur adsorption physique sur la surface. Leur adsorption est due à des forces de Van der Waals, électrostatiques ou encore à des interactions hydrophobes ou des liaisons hydrogène. Des protéines présentent dans la MEC telles que le collagène, la gélatine ou encore la fibronectine font partie de la grande variété de macromolécules ayant été étudiées comme revêtement biologiquement actif sur des fibres élaborées par « electrospinning ».[220,268,283,284] La présence de protéines issues de la MEC a révélé

une amélioration des propriétés biologiques (prolifération cellulaire, différentiation,…) pour plusieurs types cellulaires.[220,283,284] Bien que cette technique de l'adsorption physique ait l'avantage d'être simple, elle met en jeu des forces de liaison relativement faibles et peut, par conséquent, conduire à une perte de l'activité biologique des molécules en surface en raison de leur désorption. La nécessité d'avoir des signaux prolongés et stables pour la régénération tissulaire peut être une des limites de cette technique.[268] Outre les molécules biologiques, les biocéramiques tels que l'hydroxyapatite et les TCPs peuvent aussi être déposées et adsorbées en surface des matériaux afin de promouvoir la différentiation des cellules vers des phénotypes ostéoblastiques.[285, 286] C'est d'ailleurs la principale voie de fonctionnalisation de fibres de polyesters pour des applications en ingénierie des tissus osseux.

1.3.2.2 Greffage covalent de molécules biologiques

L'approche qui consiste à modifier la chimie de surface du matériau pour tendre vers un matériau biomimétique passe par une fonctionnalisation par greffage covalent d'une biomolécule. Les modifications chimiques présentées dans la section précédente doivent être opérées en amont afin de produire des groupements fonctionnels réactifs **(Figure 1-20)**.[220, 269] Le couplage chimique d'agents biologiques en surface est préférable à une simple adsorption pour éviter son relarguage et promouvoir son efficacité localement. Cependant, le couplage covalent peut entraîner une inactivation partielle des molécules immobilisées si leurs sites biologiquement actifs sont chimiquement modifiés. C'est pourquoi le greffage de peptides est souvent préféré au couplage de la protéine dans son intégralité.

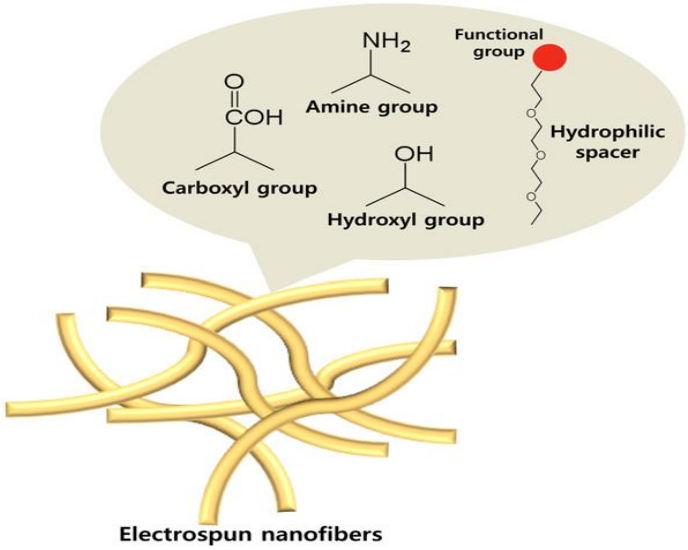


Figure 1-20 : Les principaux groupements fonctionnels de surface pour le couplage avec des molécules bioactives.[269]

Les amines primaires et les acides carboxyliques sont les fonctions les plus utilisées afin d'immobiliser des molécules bioactives sur la surface des fibres. Grâce à l'activation du groupement acide carboxylique par les agents de couplage EDC/NHS, la surface des fibres peut être conjuguée significativement à l'amine primaire d'une molécule bioactive.[277, 287] Plusieurs travaux révélant des couplages entres des fibres notamment à base de PAA et des biomolécules ont également été rapportés [269]. Les fonctions amine sont aussi des candidates intéressantes pour la modification covalente de fibres électrofilées en raison de leur forte réactivité.

Néanmoins, le couplage direct des agents biologiques sur la surface présente certaines limites au niveau de la reconnaissance cellulaire, en raison des interactions difficiles avec les molécules greffées et souvent insuffisamment exposées à cause de l'encombrement stérique au sein de la structure fibreuse.[269] Par conséquent, divers bras espaceurs hydrophiles situés entre la biomolécule d'intérêt et la surface de la fibre ont été introduits afin de faciliter les interactions avec la membrane cellulaire. Dans cette optique, les bras espaceurs sont principalement à base de PEG et chimiquement attachés à une longue chaîne de polymère hydrophobe servant à l'élaboration des fibres par « electrospinning ».[288-290] Ce système a permis d'immobiliser le facteur de croissance rhEGF (recombinant human Endothelial Growth Factor) pour des applications de cicatrisation suivant l'approche illustrée par la **Figure 1-21**.[288-290] Dans un premier temps, un copolymère dibloc PCL-PEG-NH_2 est synthétisé et électrofilé ; le chaînon PEG qui est hydrophile offre une parfaite exposition à la fonction amine dans un milieu aqueux. Ces groupements maintenant mobilisables sont alors employés pour immobiliser le facteur de croissance rhEGF, responsable de la différentiation des kératinocytes. Les résultats *in-vivo* ont révélé le rôle fondamental joué par les fibres modifiées dans la cicatrisation, mais également que l'activité de rhEGF immobilisé était comparable à celle du EGF natif. Des systèmes similaires ont permis d'améliorer les propriétés biologiques des matrices avec notamment l'augmentation de la prolifération de cellules NIH3T3 sur des fibres greffées avec la séquence peptidique Gly-Arg-Gly-Asp-Tyr (GRGDY), responsable de l'adhérence cellulaire [290], mais aussi l'activité enzymatique grâce à l'immobilisation de lysozyme.[289] La fonctionnalisation de surface fondée sur un mélange avec un copolymère dibloc amphiphile possède plusieurs avantages tels que le contrôle de la quantité de molécules bioactives à immobiliser en surface par la variation du rapport homopolymère/copolymère dans la solution pour l' « electrospinning ». La fonction amine du copolymère sera préférentiellement orientée vers la surface en raison de la nature hydrophile du chaînon de PEG reliant, par conséquent, le degré d'immobilisation à la quantité de copolymère.

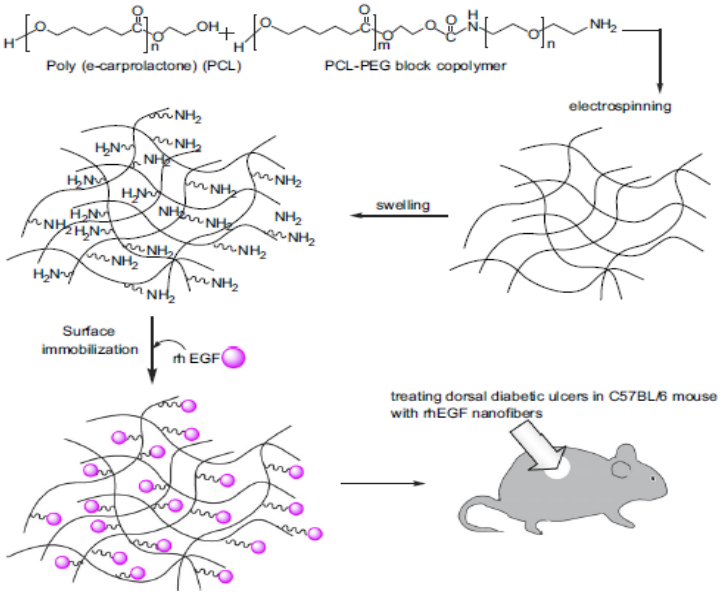


Figure 1-21 : Approche expérimentale développée par Choi et al pour la préparation de fibres fonctionnalisées par le facteur de croissance rhEGF.[288]

Le **Tableau 1-5** regroupe les exemples de matrices fibreuses réalisées par « electrospinning » ayant été fonctionnalisées par couplage covalent de molécules biologiques. Il est important de rappeler que pour des applications en régénération osseuse, le procédé de fonctionnalisation le plus couramment utilisé consiste essentiellement à associer des biocéramiques ou encore à introduire des protéines morphogénétiques des os (BMP) au sein des matrices fibreuses. Ces approches seront développées lors de la section 1.3.3.

Tableau 1-5 : Méthodes de fonctionnalisation de surface de matrices à base de polyesters pour des applications dans le domaine biomédical.

Pol.	Méthode	Agent de couplage	Molécule biologique	Type cellulaire	Application	Ref
PCL	Plasma	EDC/NHS	Gélatine	Cellules endothéliales	Régénération vasculaire	[287]
PCL	Plasma	EDC/NHS	Laminine	PC12	Régénération nerveuse	[291]
PCL	Aminolyse (Hexanediamine)	Glutaraldéhyde)	Gélatine, Collagène, Chitosane	Cellules endothéliales	Amélioration du développement cellulaire	[292]
PCL	Electrospinning avec PCL-*b*-PEG-NH_2	Hydrobenzole /EDC	EGF	Kératinocytes	Cicatrisation cutanée	[288]
PCL	Electrospinning avec PCL-*b*-PEG-NH_2	EDC/NHS	Lysosyme	-	Activité enzymatique après greffage	[289]
PLACL	NaOH hydrolyse	EDC/NHS	Fibronectine	hMSCs	Ingénierie tissulaire générale	[293]
PLACL	Aminolyse	EDC/NHS	RGD	-	-	[293]
PLACL	Aminolyse (Hexanediamine)	Glutaraldéhyde	Fibronectine	Cellules endothéliales	Ingénierie tissulaire de l'œsophage	[277]
PLA	Plasma	EDC/NHS	Laminine	Cellules de rat	Régénération nerveuse	[294]
PLA	NaOH hydrolyse	EDC/NHS avec héparine puis EDC/NHS avec molécules bio.	bFGF Laminine	Fibroblastes	Cicatrisation cutanée	[295]
PLA	Aminolyse (Hexanediamine)	EGS puis EDC/NHS	RGD Heparin	hMSCs	Tissu adipeux	[293, 296]
PLGA	Electrospinning avec PLGA-*b*-PEG-NH_2	EDC/NHS	RGD	Fibroblastes	Cicatrisation cutanée	[290]
PLA, PGA, PLGA	Plasma + grafting from PAA	-	-	Fibroblastes	Introduction de fonctions COOH	[281]
PET	Ce(IV) + grafting from PAA	EDC/NHS	Gélatine	Cellules endothéliales	Régénération vasculaire	[282]

La faible quantité de travaux (**cf. Tableau 1-5**) axés sur la modification covalente de surface de matrices fibreuses offre un réel champ d'investigation, en particulier pour les PHAs où aucune étude n'a été rapportée.

1.3.3. Co-electrospinning

Alors que les techniques de modification de surface susmentionnées sont prévues pour des matériaux fibreux élaborés au préalable, des nanoparticules de biocéramiques, certaines protéines ou des chaînons de polymères fonctionnels (tels que les bras espaceurs décrits précédemment) peuvent être directement exposés à la surface des fibres lors de « co-electrospinning » à partir d'une solution de polymère contenant les composés d'intérêts pour des applications destinées à l'ingénierie tissulaire. En outre, des principes actifs hydrophobes et des agents antibactériens peuvent également être incorporés au sein des fibres pour d'autres applications.[297, 298] Des mélanges de PLA [149], de PLGA [299], de PCL [300] ou encore de PLACL [133] en présence de nanoparticules d'hydroxyapatite et co-electrofilés conduisent à la génération de fibres présentant une surface modifiée. Cette fonctionnalisation a notamment révélé des cinétiques de différentiation cellulaire favorisées pour les fibres composites. Cependant, Gupta *et al.*[133] ont montré les limites de cette technique en démontrant que la majeur partie des nanoparticules se trouve au cœur des fibres et non à la surface, ce qui ne permet pas de fortes interactions avec les cellules et par conséquent masque l'activité biologique des nanoparticules. L'incorporation de facteurs de croissance ou d'enzymes au sein des fibres par « co-electrospinning » est délicate en raison des solvants principalement organiques, responsables de leur dégradation et/ou leur dénaturation.[220, 269] Néanmoins, certaines macromolécules naturellement présentes dans la MEC peuvent être incorporées dans la solution de polymère en utilisant par exemple des solvants fluorés. La génération de fibres synthétiques biofonctionnalisées par des protéines bioactives de la MEC permet de garder une structure stable ainsi qu'une tenue mécanique adaptée à la régénération tissulaire tout en introduisant des fonctionnalités biologiques à l'origine d'un développement cellulaire amélioré. Le collagène, la gélatine et divers polysaccharides améliorent les propriétés biologiques de fibres synthétiques.[22, 133, 147, 220, 301, 302]

D'autres facteurs de croissance tels que les facteurs de croissance endothéliaux ont également été introduits au sein de fibres de polyesters par différentes méthodes comme le mélange classique des deux partenaires ou l'utilisation d'une seringue co-axiale. Dans le domaine de la régénération osseuse, plusieurs travaux ont été rapportés sur la fonctionnalisation de matrices de PLGA réalisées à partir d'une émulsion contenant dans la phase aqueuse les BMPs.[303, 304] Les résultats *in-vitro* et *in-vivo* ont montré une différentiation des cellules souches et une cicatrisation des lésions osseuses améliorées révélant, par conséquent des matériaux à fort potentiel pour l'ingénierie des tissus osseux.

1.4. Elaboration de fibres à base de polyesters bactériens

La PCL ainsi que le PLA et les copolymères associés (PLGA, PLACL) sont les polymères synthétiques les plus utilisés pour des applications en ingénierie tissulaire utilisant des matrices élaborées par « electrospinning », comme l'atteste le nombre croissant de publications au cours des 10 dernières années (**Figure 1-22**). Bien qu'ils soient biodégradables et biocompatibles, ils présentent plusieurs inconvénients tels qu'une cinétique de dégradation lente pour la PCL, ou trop rapide, responsable de l'effondrement prématuré de la structure et de l'apparition de produits de dégradation à l'origine de réponses inflammatoires, dans le cas du PLA.[53] De façon alternative, les PHAs sont une classe émergeante de polyesters biodégradables, biocompatibles et biosourcés dans le domaine de l'ingénierie tissulaire du fait de la grande flexibilité de leurs propriétés de dégradation et mécaniques ainsi qu'en raison de leur capacité à supporter la croissance cellulaire et la régénération *in vivo* de divers tissus (cf. section 1.1.1.4).[156, 161, 162] De plus, plusieurs études ont montré que leurs produits de dégradation tels que les monomères et oligomères de 3-hydroxybutyrate et des 3-hydroxyacides dérivés ne sont pas toxiques pour les cellules et pourraient même avoir des effets nutritionnels et thérapeutiques.[305-307] Malgré leur forte potentialité, seulement 40 articles portant sur des architectures fibreuses à base de PHAs élaborées par « electrospinning » ont été rapportés pour des applications en ingénierie tissulaire (**Figure 1-22C**). Cependant, le nombre de publications par an tend à augmenter, notamment depuis les 5 dernières années, ce qui laisse présager que les PHAs offrent de réelles perspectives d'applications pour l'ingénierie tissulaire et constituent une alternative intéressante aux matériaux actuellement utilisés. Au cours de cette partie, nous allons dresser une liste exhaustive de l'utilisation de matrices tridimensionnelles fibreuses à base de PHAs réalisées par « electrospinning » pour diverses applications biomédicales.

Jusqu'à présent seulement trois PHAs (le PHB, le PHBHV et le PHBHHx) ont été étudiés par « electrospinning ».

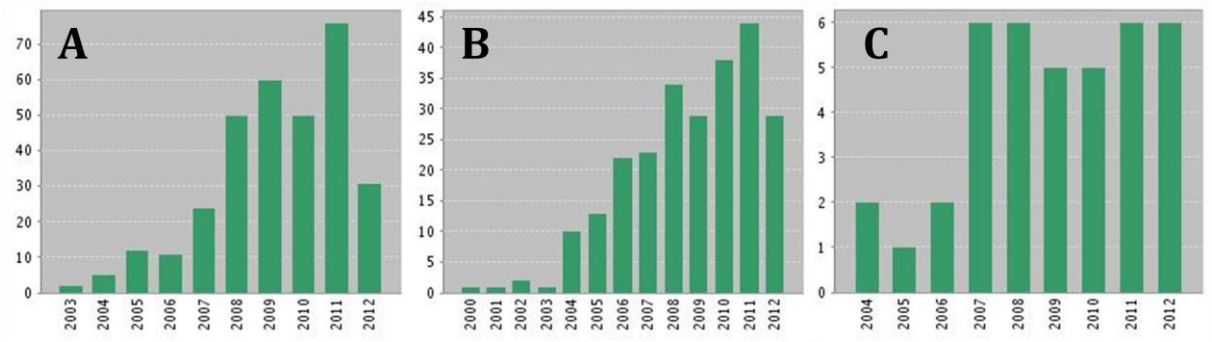


Figure 1-22 : Graphiques reflétant le nombre de publications par an indexées dans Web of Science® pour les mots clés : electrospinning, tissue engineering et A) poly(ε-caprolactone) B) poly(lactic acid) C) poly(3-hydroxybutyrate).

1.4.1. Etudes sur le procédé d' « electrospinning » appliqué aux PHAs

Les premiers travaux sur l'élaboration de structures fibreuses électrofilées à base de PHAs ont été rapportés en 2004. Lors de cette première étude, Choi *et al.*[308] ont fabriqué des fibres de PHBHV de diamètre compris entre 1 µm et 4 µm à partir d'une solution de chloroforme dont les propriétés de conductivité ont été modulées par l'introduction de sels organosolubles. La conductivité de la solution impacte la morphologie des fibres (réduction de la quantité de défauts), mais aussi la cinétique de dégradation qui augmente avec la diminution de la taille des fibres, en raison de l'augmentation de la surface spécifique.

D'autre part, à partir de 2006, l'équipe de Suphatol a élaboré des matrices microfibreuses à base de PHB, PHBHV ou de mélanges en proportion variable des deux polyesters pour des applications dans le domaine biomédical.[309] La morphologie des fibres sera précisément discutée en fonction des conditions de fabrication afin de déterminer les paramètres optimaux pour la génération d'une structure uniforme. A titre d'exemple la **Figure 1-23** révèle qu'à partir d'une concentration de 14 % (m/v) et d'un voltage de 12 kV, les fibres ne présentent plus de défauts. Par ailleurs, la topologie de la surface poreuse des fibres attribuée à la rapide évaporation du chloroforme sera précisément démontrée. Les propriétés mécaniques et thermiques de ces matrices ont été caractérisées, et il est clairement établi qu'elles peuvent facilement être modulées.

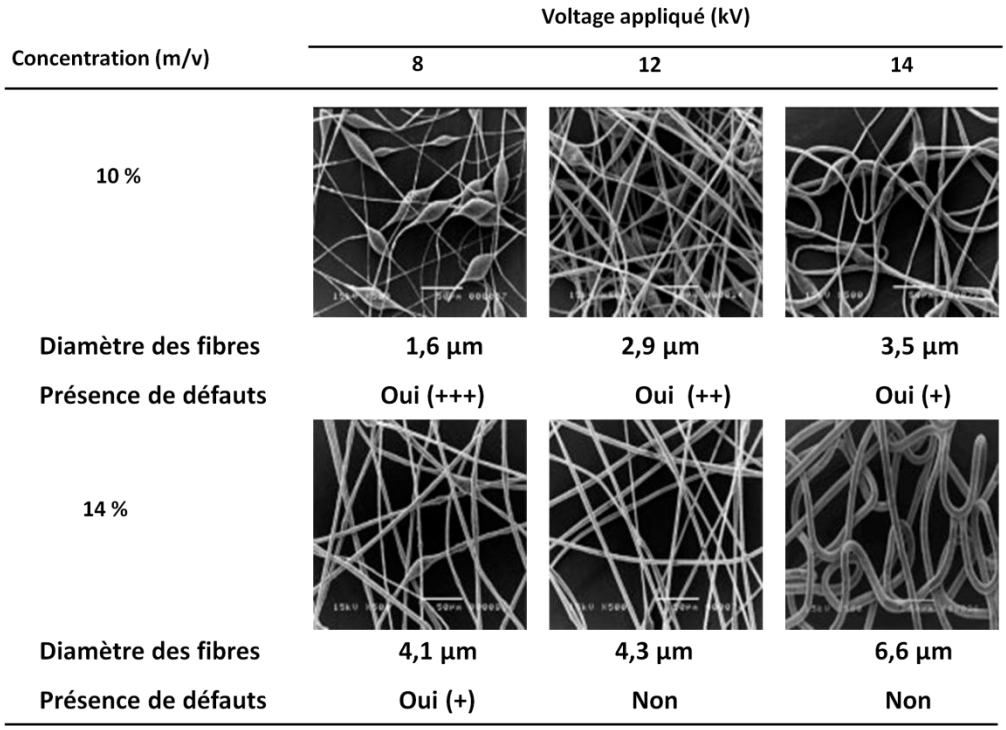


Figure 1-23 : Sélection d'images de MEB illustrant les effets du voltage appliqué et de la concentration sur la morphologie et le diamètre des fibres.

En 2008, une matrice à base de PHBHHx[310] fabriquée par « electrospinning » à partir d'un mélange chloroforme/diméthylformamide a été étudiée. Une variété de paramètres a été ajustée tels que le rapport entre les deux solvants, le champ électrique ou encore la concentration afin de déterminer les conditions optimales de fabrication. A titre d'exemple, la taille de fibres la plus fine obtenue est de 340 nm. Les matériaux fibreux réalisés ont été ensuite caractérisés morphologiquement, thermiquement et mécaniquement dans le but de mettre en évidence les différences avec une membrane réalisée par évaporation de solvant. En outre, une étude a également rapporté la fabrication de matrice de PHBHHx dans le chloroforme et l'influence de l'addition de différents sels organosolubles sur la morphologie du matériau.[311]

Des investigations fondamentales ont également été conduites sur des matrices fibreuses à base de PHAs notamment avec l'analyse de l'impact des différents paramètres d' « electrospinning » sur le diamètre et l'alignement des fibres de PHBHV [312], mais aussi en étudiant l'indice de perméabilité de plusieurs réseaux fibreux de PHB fabriqués dans diverses conditions.[313] Tong *et al.* ont systématiquement utilisé une approche factorielle pour évaluer le degré d'influence de chaque paramètre et déterminer que la concentration/viscosité de la solution est la composante affectant le plus fortement le diamètre des fibres.[312]

D'autre part, l'élaboration de matériaux fibreux par « electrospinning » à partir de mélanges PHBHV/PCL [314] et PHBHHx/PLA [315] a été réalisée dans le but de fabriquer des structures aux propriétés mécaniques et de dégradation variables : en effet, la PCL est caractérisée avec une T_g de -60 °C conférant un comportement plastique à température ambiante alors que le PLA s'hydrolyse plus rapidement que le PHBHHx. Pour chaque matériau, des analyses précises de la microstructure par MEB et diffraction des rayons X aux grands et petits angles ont révélé que les chaînes macromoléculaires sont mélangées au sein des phases amorphes tandis que les polyesters cristallisent indépendamment générant par conséquent une séparation des domaines cristallins. Il est à noter que dans le cas du mélange PHBHHx/PLA, seul le PHBHHx cristallise en raison du caractère racémique du PLA mais aussi que sa cristallisation n'est pas gênée par la présence de chaînes amorphes. Des analyses mécaniques et thermiques ont également été effectuées sur ces matrices montrant des variations des propriétés en fonction des mélanges et de la ségrégation structurelle de phases.

1.4.2. Impact biologique d'une matrice à base de PHAs

En 2004, Lee *et al.*[316] ont réalisé des fibres de PHBHV de 185 nm de diamètre à partir d'une solution de trifluoroéthanol et rapporté pour la première fois le caractère non-cytotoxique de ces matrices fibreuses à base de PHAs sur des chondrocytes d'oreilles de lapin. L'étude *in-vitro* met en évidence une morphologie cellulaire étalée sur la structure démontrant des interactions support/cellule favorables (**Figure 1-24**).

Dans l'optique de mimer au mieux la MEC naturelle, entre 2005 et 2008, plusieurs groupes de recherche ont élaboré des supports à base de PHBHV incorporant des biocéramiques,[285] du collagène[301] ou de la gélatine.[302, 317] La fonctionnalisation par des microparticules d'hydroxyapatite, connues pour leurs propriétés d'ostéoconduction, a été réalisée par immersions successives dans une solution d'hydroxyde de calcium puis de fluide biologique simulé pendant une semaine afin de générer le biocéramique en surface.[285] En outre, l'introduction de microparticules d'hydroxyapatite n'affecte pas significativement l'adhésion cellulaire. Parallèlement, les cinétiques de dégradation enzymatique des matériaux immergés dans une solution de PHB dépolymérase sont augmentées en raison de la meilleure mouillabilité des structures biocomposites. L'introduction de biocéramiques au sein des matrices de PHAs a également été rapportée par des équipes de recherche qui ont élaboré des structures composites par « electrospinning » de solutions contenant différentes quantités d'hydroxyapatite conduisant à la formation de nanoparticules au sein des fibres pour différentes applications en

ingénierie des tissus osseux.[318, 319] Par ailleurs, Bretcanu *et al.* ont développé l'utilisation de PHAs comme revêtement en électrofilant une solution de PHB directement sur un verre bioactif (**Figure 1-24C**) afin de favoriser diverses interactions.[318] Les études *in-vitro* dans des fluides biologiques simulés ont révélé, après 7 jours d'immersion, la formation d'une couche de cristaux d'hydroxyapatite adaptée à la régénération osseuse. Les fibres de PHBHV ont également été fonctionnalisées par une protéine de la MEC par électrofilage d'une solution contenant le PHBHV et le collagène ou la gélatine dans l'hexafluoro-2-isopropanol. Il est constaté une nette amélioration de la prolifération des fibroblastes NIH3T3 après 68 heures liée à la formation d'un microenvironnement mimant la MEC. Ce microenvironnement est porteur de signaux interagissant avec les protéines de la membrane cellulaire, ce qui favorise l'attachement et le développement des cellules.[301]

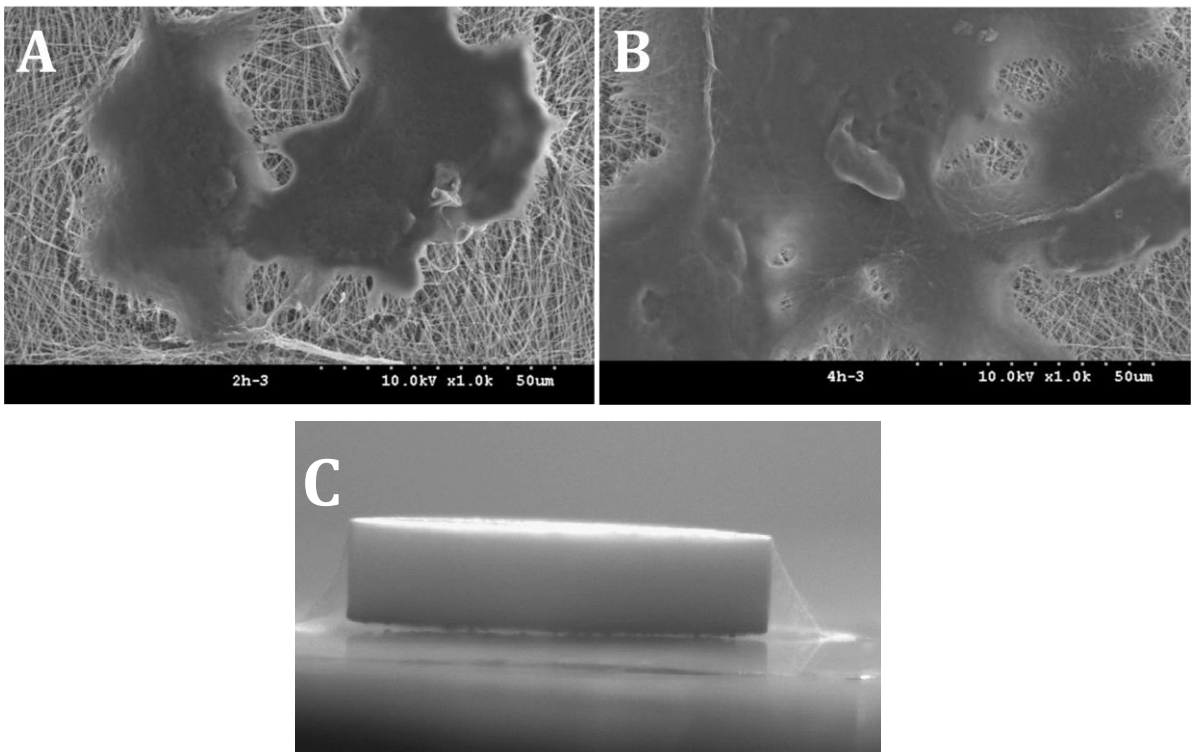


Figure 1-24 : Images de MEB de chondrocytes attachés sur une matrice de PHBHV après A) 2 h et B) 4h. [316] C) Fibres de PHB recouvrant une pastille de verre bioactif.[318]

La cytotoxicité des matrices réalisées à base de PHB et PHBHV ainsi que leur capacité à supporter la croissance cellulaire ont été testées avec plusieurs types cellulaires comme des fibroblastes de souris (L929) [320], des cellules de Schwann (régénération des nerfs) [320] ou encore des ostéoblastes humains (SaOS-2).[321] Les résultats montrent que les cellules de Schwann ont

des difficultés à adhérer sur un support à base de PHAs après 8 heures et 24 heures de culture. Néanmoins, les études de prolifération ont révélé que ces cellules ne sont pas adaptées à un développement sur une structure fibreuse en raison de leur nette prolifération après 5 jours sur les films de PHAs réalisés par évaporation de solvant. En outre, les fibroblastes adhèrent parfaitement à la surface des fibres après seulement 8 heures de mise en culture et leur population augmente après 3 jours de prolifération. Par ailleurs, les ostéoblastes déposés sur les microfibres à base de PHAs n'adhèrent qu'à hauteur de 50 % après 4 heures de mise en culture, en raison de leur surface hydrophobe dépourvue de sites de reconnaissance cellulaire.[321] Cependant, après 16 et 24 heures de culture, les cellules en développement sur les supports fibreux montrent un fort attachement avec des résultats comparables à ceux des puits de contrôle. Les cinétiques de prolifération à 72 et 120 heures montrent une population de cellules en augmentation jusqu'à atteindre un plateau correspondant à la confluence et confirmant que ces structures sont adaptées aux ostéoblastes (**Figure 1-25A**). Il est important de préciser que les matériaux sous forme de films présentent des quantités de cellules dosées inférieures à celles des matériaux tridimensionnels. Le travail réalisé par Sombatmankhong *et al.*[321] permet également d'observer le processus de développement des ostéoblastes sur les fibres avec notamment l'apparition de filopodes, illustrée comme exemple sur la **Figure 1-25B**, qui sont des projections cytoplasmiques responsables de l'accrochage des cellules sur un support attestant, par conséquent, d'une biocompatibilité effective du matériau. Par ailleurs, la fonctionnalité des SaOS-2 a été démontrée par le dosage de la phosphatase alcaline qui est une enzyme impliquée dans la formation de tissus osseux, confirmant ainsi que les cellules sont actives et que les biomatériaux fibreux à base de PHAs sont adaptés à la régénération osseuse.

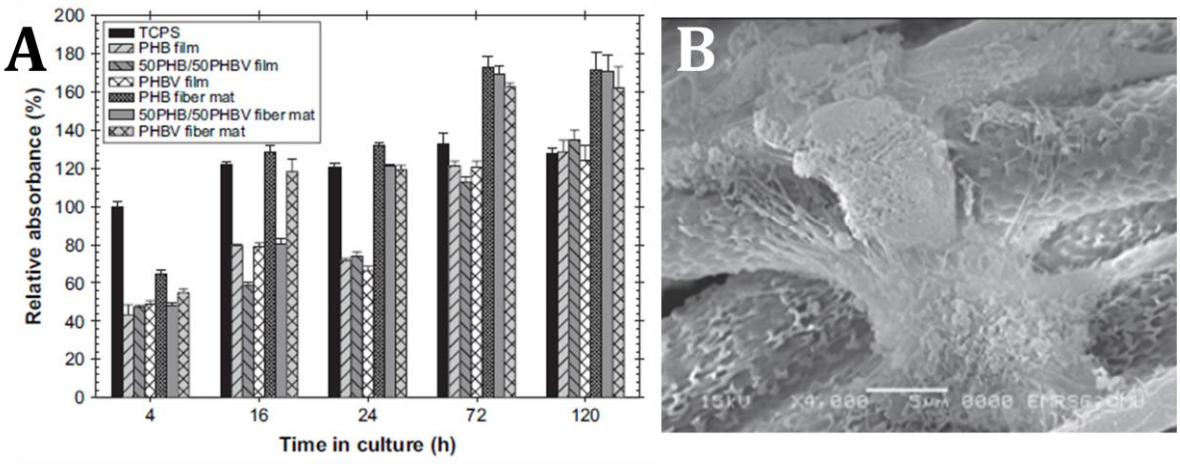


Figure 1-25 : A) Adhésion et prolifération d'ostéoblastes sur des films et des fibres de PHAs (TCP (tissue cultured polystyrene) est utilisé comme contrôle) et B) Image de MEB d'un ostéoblaste en développement sur des fibres de PHB après 24 heures de culture.[321]

En 2007, l'équipe de Kang a réalisé des études de cicatrisation de plaies dans des conditions *in-vivo*[63] avec des matrices en PHBHV et PHBHV/Collagène.[301] Dans un premier temps, des cellules épithéliales de la couche externe (ORS) et des cellules du derme (DS) sont mises en coculture *in-vitro* sur les deux matrices à base de PHAs afin de déterminer leur capacité à adhérer sur ces architectures fibreuses. Les résultats montrent que les ORS peuvent adhérer à la surface seulement en présence des DS. De plus, lors de culture de DS uniquement, il a été révélé que leur attachement est effectif après 2 heures sur les fibres PHBHV/collagène et qu'elles atteignent leur confluence après 6 heures, alors qu'au contact des fibres de PHBHV, les cellules n'adhèrent qu'après 6 heures et leur confluence n'est établie qu'après 24 heures. La présence d'une protéine de la MEC, comme le collagène, améliore l'activité biologique du biomatériau. D'autre part, les marqueurs immunohistochimiques ont révélé une plus grande production de MEC en présence de collagène, due à un attachement plus rapide des cellules. Bien que la présence de collagène favorise le développement cellulaire dans les conditions *in-vitro*, les études montrent qu'après 9 jours d'application sur la plaie, la matrice uniquement à base de PHBHV conduit à une meilleure cicatrisation ainsi qu'à une plus forte re-épithélisation comparé au dispositif biofonctionnalisé avec du collagène. L'application des matrices chargées de cellules sur les plaies implique une plus grande régénération de l'épiderme (**Figure 1-26**). D'après Han *et al.*[63], bien que le collagène introduise une plus grande mouillabilité et un meilleur développement cellulaire *in-vitro*, il ne contribue pas essentiellement au processus de guérison, tandis que les propriétés physiques et mécaniques du PHBHV semblent être un facteur plus important dans les premières étapes de cicatrisation, attestant du potentiel d'utilisation du PHBHV comme pansement biologique. Il est important de préciser la présence de quelques résultats pour des matériaux à base de PHBHV/Gélatine dans cette étude. Pour les tests *in-vitro*, les résultats révèlent une meilleure adhésion des cellules en comparaison avec les fibres de PHBHV seul mais inférieurs à ceux obtenus en présence de collagène.

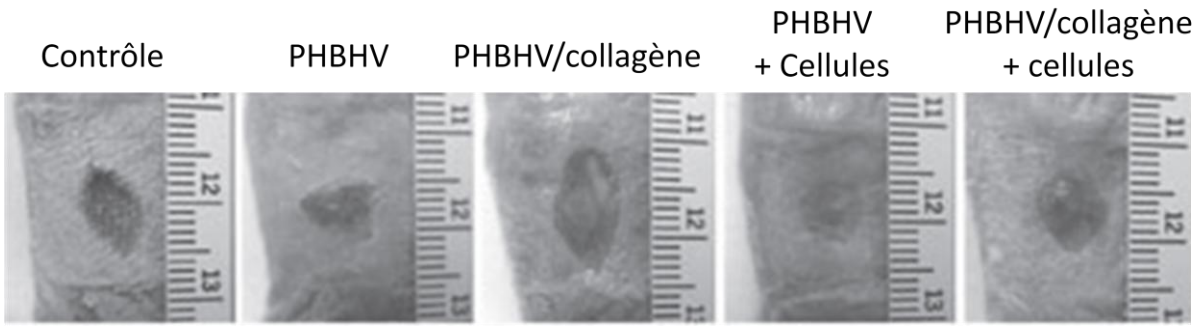


Figure 1-26 : Evolution de la cicatrisation de la plaie après 9 jours en présence de différentes matrices.[63]

Des investigations biologiques ont également révélé que les structures à base de PHBHHx sont biocompatibles et adaptées pour supporter la croissance de cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSCs) [322] et de neurones issus de cervelle de rat (rCGNs).[323] D'autre part, des fibres de PHB et de PHBHV ont également été fonctionnalisées par « co-electrospinning » de mélanges de chitosane/PHAs et les tests de cytocompatibilité avec des fibroblastes (L929) ont révélé des effets légèrement bénéfiques sur la prolifération cellulaire.[324, 325] Une étude similaire mélangeant le PHBHV avec le PLA ou le PLGA rapporte des résultats pertinents de prolifération et différentiation *in-vitro* d'ostéoblastes humains pour tous les matériaux évalués.[326] Plus original, le PHBHV a été fonctionnalisé par des nanotubes de carbone connus pour leurs excellentes propriétés de conductivité thermique et électrique pouvant être adaptées à certaines applications dans le domaine biomédical.[327]

C'est au cours de ces deux dernières années que des investigations biologiques plus poussées sur des matrices à base de PHAs ont été rapportées.[160, 328-330] Tout d'abord dans le domaine de la régénération de la peau, des matrices de PHB/poly(vinyl alcool) (PVA)ont été réalisées. L'incorporation de PVA amène un caractère hydrophile à la structure entraînant des cinétiques de dégradation de PHB plus rapides en raison de la pénétration favorisée des molécules d'eau. Cependant, les résultats des études de prolifération *in-vitro* réalisées sur des kératinocytes humains (HaCat) et des fibroblastes révèlent des valeurs significativement plus élevées de croissance cellulaire et de recouvrement de surface sur les matrices hydrophobes de PHB comparé aux matrices composées d'un mélange PHB/PVA.[160] Par ailleurs, Kuppan *et al.*[328] ont analysé l'évolution de fibroblastes dans des conditions *in-vitro* sur une matrice de PHBHV mais aussi le potentiel de cicatrisation de ces dispositifs lors d'études *in-vivo* sur des rats. Les études *in-vitro* révèlent des résultats de prolifération comparables à ceux des puits contrôle après 7 jours d'incubation, mais aussi une production supérieure de collagène I, qui est la protéine en charge de fournir une tenue mécanique appropriée aux zones endommagées, par les cellules en développement sur les matériaux fibreux

De plus, la faible régulation du collagène III, qui est chargé d'apporter un soutien aux matériaux à faible comportement mécanique dans les premières étapes de cicatrisation, indique que ces structures confèrent les propriétés physiques appropriées à la rapide prolifération des fibroblastes. La cicatrisation de la plaie dans les conditions *in-vivo* montre que la présence de R-Spondin 1 (facteur activant une protéine accélérant l'angiogénèse) est primordiale afin d'obtenir une guérison rapide. Cependant, les observations histologiques révèlent que l'application de la matrice de PHBHV en présence de R-Spondin 1 favorise la re-épithélisation, confirmant que la géométrie des fibres améliore la colonisation des cellules sur le site endommagé.

Très récemment, certaines équipes de recherche se sont intéressées aux effets de la morphologie des architectures élaborées sur des cellules à fort potentiel, car multipotentes, telles que les MSCs [329-331]. En effet, Lu *et al.*[330] ont analysé le développement de cellules souches issues de moelle osseuse sur des fibres de PHBHV de différents diamètres et degrés d'orientation. Bien que le fort potentiel de ces matériaux pour la régénération tissulaire soit confirmé par l'observation de cinétiques de prolifération intéressantes, les résultats indiquent que des microfibres ainsi que des structures orientées ne favorisent pas la croissance cellulaire comparées aux fibres nanométriques organisées de manière aléatoire. Il a été également observé que les fibres orientées affectent la morphologie des cellules en guidant les projections du cytosquelette dans le sens d'orientation de la matrice. D'autre part, une étude analogue a démontré que les MSCs se développent de manière similaire sur des matrices fibreuses (fabriquées par « electrospinning ») et poreuses (par extraction d'un porogène) tandis que les cellules épithéliales de rein de singe (Vero) présentent davantage d'interactions avec le dispositif poreux. Cependant, il a été établi que les structures fibreuses présentent plusieurs avantages, notamment mécaniques, rendant ces matériaux mieux adaptés au développement cellulaire.[331] L'étude la plus récente rapportée a été effectuée sur des biomatériaux à base de PHBHHx où le cytosquelette des cellules adopte plusieurs conformations (**Figure 1-27**).[329] Wang *et al.* ont mis en évidence de manière très précise que les MSCs en développement sur des fibres alignées et sans organisation présentent un total de 67 gènes exprimés de façon différente. De plus, la plupart de ces gènes sont impliqués dans la production des filaments d'actine du cytosquelette et dans l'adhésion cellulaire. Les résultats ont montré que les gènes responsables de la différentiation ostéogénique (ostéocalcine, ostéonectine, osteopontine et RunX2) ont une plus forte activité sur les fibres alignées. Cela est dû à un environnement mécanique favorable (plus forte contrainte de traction) contribuant ainsi à l'ostéogénèse par les réponses de diverses intégrines transmembranaires qui jouent un rôle primordial vis-à-vis des interactions cellules/support. Par ailleurs, les auteurs expliquent que les stratégies impliquant des orientations guidées de la morphologie des cellules sont de plus en plus rapportées comme des outils efficaces pour initier les programmes de différentiation des MSCs.[329]

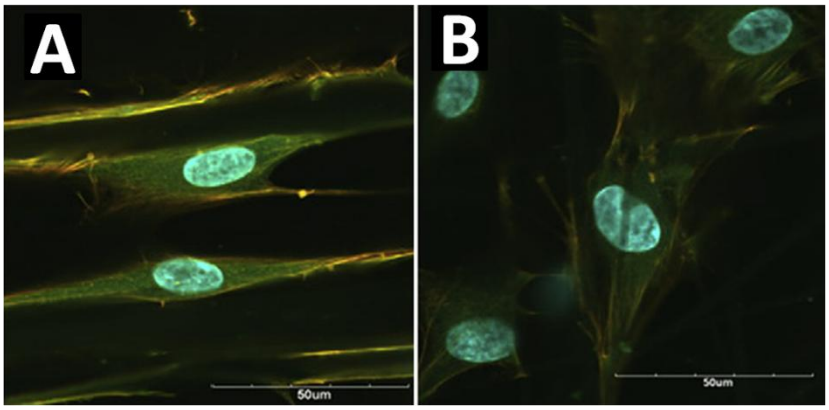


Figure 1-27 : Adhésion focale et morphologie du cytosquelette des MSCs mis en culture sur des matrices de PHBHHx après 3 jours observées par microscopie confocale. A) fibres alignées et B) fibres sans organisation.[329]

Enfin, plusieurs travaux ont également été rapportés sur l'élaboration de matrices fibreuses à base de PHAs pour d'autres applications que l'ingénierie tissulaire comme le relarguage de molécules pour des applications biomédicales ou antibactériennes. Il a été constaté que l'introduction de nanoparticules d'argent [332], d'oxyde de zinc [333], de polyphénols [334] ou encore de kanamycine sulfaté [335] au sein des fibres permettent de réduire considérablement, et dans certains cas complètement, l'adhérence bactérienne sur ces matériaux. Les PHAs ont également été mis en œuvre en utilisant la technique de l' « electrospinning » coaxial avec la réalisation de fibres composées d'une couronne de chitosane et d'un cœur de PHBHV [336] et également la formation de fibres creuses de PHB (**Figure 1-28**).[337] Ces canaux de PHB sont issus de l'extraction du cœur des fibres, composé de PLA amorphe, par le diméthylformamide. L'application première de ces fibres cœur/couronne (PLA/PHB) consiste en l'élaboration d'un biomatériau capable de libérer efficacement la diméthyloxalylglycine. Il a été démontré que l'incorporation du principe actif au sein du cœur PLA des fibres générées, permet de limiter l'effet « burst » usuellement observé pour les fibres conventionnelles composées d'un polymère unique. D'autres études de libération de principes actifs ont été réalisées sur des matrices à base de PHAs fabriquées par « electrospinning ». En effet, Wang *et al.* ont observé la libération d'une molécule bioactive depuis des fibres mixtes de poly(*N*-vinylpyrrolidone) (PVP) greffée à une chaîne principale de PHBHV par chimie radicalaire. Les résultats ont révélé que l'augmentation de la quantité de molécules libérées était corrélée avec la quantité de greffons hydrophiles de PVP.[338] D'autre part, les matrices de PHBHV ont montré leur fort potentiel pour la culture de cellules cancéreuses et l'évaluation de plusieurs médicaments anticancéreux [339].

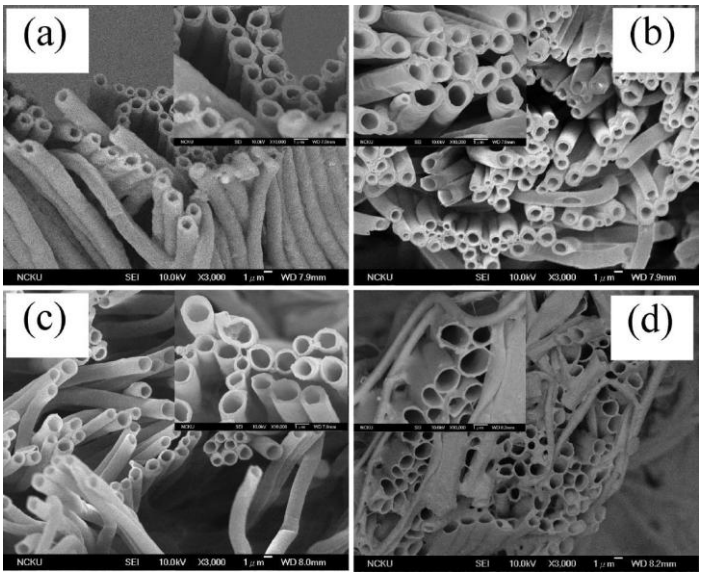


Figure 1-28 : Images de MEB de fibres cœur/couronne PHB/PLA après extraction du PLA.[337]

1.5. Conclusion

Cette étude bibliographique montre le fort développement de l'ingénierie tissulaire, et plus particulièrement dans le domaine des tissus osseux au cours de ces dernières années. Plusieurs stratégies ayant pour but d'élaborer un matériau répondant au mieux aux propriétés physico-chimiques et biologiques exigées pour soigner la zone endommagée ont été étudiées. Dernièrement, la technique de l' « electrospinning », qui permet de générer des matériaux fibreux à forte porosité, a acquis une certaine notoriété en raison de la grande similarité morphologique de ces structures avec la MEC naturelle. D'une manière générale, les études ont montré une bonne biocompatibilité in vitro des matériaux à base de polyesters, en particulier, lorsqu'ils sont fonctionnalisés. Mais il est difficile de comparer toutes ces études entre elles. En effet, de nombreux paramètres diffèrent, comme la nature des cellules, les matériaux étudiés, le mode d'élaboration, et surtout la fonctionnalisation. Ce dernier paramètre apparaît comme le facteur le plus important pour induire une meilleure biocompatibilité et bioactivité du matériau.

Bien que les PHAs bactériens soient connus depuis environ un siècle et présentent également de nombreuses caractéristiques intéressantes telles que leur biocompatibilité, leur biodégradabilité et leur large gamme de propriétés mécaniques et thermiques, les études de ces polyesters dans le domaine biomédical sont nettement moins développées que pour d'autres polyesters comme le PLA ou la PCL. C'est pourquoi, nous avons cherché à mettre au point

plusieurs méthodes afin d'élaborer des structures fibreuses à base de divers PHAs avec différents diamètres de fibres. D'autre part, vu le très faible nombre de travaux rapportés sur la fonctionnalisation de manière covalente des matériaux fibreux à base de polyesters, nous avons développé plusieurs méthodes permettant de fonctionnaliser la surface des fibres. Différentes fonctionnalisations physiques seront également décrites au cours de ce chapitre.

Enfin, comme nous venons de le voir dans la littérature, l'utilisation de cellules souches, telle que les hMSCs, représente un axe de développement attractif depuis ces toutes dernières années en raison de leur forte potentialité à régénérer différents types de tissus incluant les os. Aussi, étudierons-nous le développement, la prolifération, la différentiation ainsi que les interactions de ces cellules avec les matériaux fibreux à base de différents PHAs fonctionnalisés.

1.6. Références Bibliographiques

1. Langer, R.; Vacanti, J., Tissue engineering. *Science* **1993,** 260, 920-926.
2. Bisceglie, V., Uber die antineoplastische immunitat: Heterologe Einpflanzung von Tumoren in Hubner-embryonen. *Ztschr. Krebsforsch* **1933,** 40, 122-140.
3. Gu, X. S.; Ding, F.; Yang, Y. M.; Liu, J., Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration. *Prog. Neurobiol.* **2011,** 93, 204-230.
4. Kim, S. H.; Oh, A. Y.; Jung, S. H.; Hong, H. H.; Choi, J. H.; Hong, H. K.; Jeon, N. R.; Kang, Y. S.; Shin, H. S.; Rhee, J. M.; Khang, G., Recent strategies of the regeneration of central nervous system by tissue engineering techniques. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **2008,** 5, 370-387.
5. Subramanian, A.; Krishnan, U. M.; Sethuraman, S., Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. *J. Biomed. Sci.* **2009,** 16.
6. Bottcher-Haberzeth, S.; Biedermann, T.; Reichmann, E., Tissue engineering of skin. *Burns* **2010,** 36, 450-460.
7. Groeber, F.; Holeiter, M.; Hampel, M.; Hinderer, S.; Schenke-Layland, K., Skin tissue engineering - In vivo and in vitro applications. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2011,** 63, 352-366.
8. MacNeil, S., Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature* **2007,** 445, 874-880.
9. Duan, D.; Klenkler, B. J.; Sheardown, H., Progress in the development of a corneal replacement: keratoprostheses and tissue-engineered corneas. *Expert Rev. Med. Devices* **2006,** 3, 59-72.
10. Shah, A.; Brugnano, J.; Sun, S.; Vase, A.; Orwin, E., The development of a tissue-engineered cornea: Biomaterials and culture methods. *Pediatr. Res.* **2008,** 63, 535-544.
11. Fiegel, H. C.; Lange, C.; Kneser, U.; Lambrecht, W.; Zander, A. R.; Rogiers, X.; Kluth, D., Fetal and adult liver stem cells for liver regeneration and tissue engineering. *J. Cell. Mol. Med.* **2006,** 10, 577-587.
12. Hammond, J. S.; Beckingham, I. J.; Shakesheff, K. M., Scaffolds for liver tissue engineering. *Expert Rev. Med. Devices* **2006,** 3, 21-27.
13. Ohashi, K., Liver tissue engineering: The future of liver therapeutics. *Hepatology Research* **2008,** 38, S76-S87.
14. Frimberger, D.; Lin, H. K.; Kropp, B. P., The use of tissue engineering and stem cells in bladder regeneration. *Regen. Med.* **2006,** 1, 425-435.
15. Korossis, S.; Bolland, F.; Ingham, E.; Fisher, J.; Kearney, J.; Southgate, J., Tissue engineering of the urinary bladder: Considering structure-function relationships and the role of mechanotransduction. *Tissue Eng.* **2006,** 12, 635-644.
16. Oberpenning, F.; Meng, J.; Yoo, J. J.; Atala, A., De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* **1999,** 17, 149-155.
17. Corvin, S.; Feil, G.; Stenzl, A., Tissue engineering of the urethra and ureter. *Urologe. A* **2004,** 43, 1213-1216.
18. Guan, Y.; Ou, L. L.; Hu, G.; Wang, H. J.; Xu, Y.; Chen, J. T.; Zhang, J.; Yu, Y. T.; Kong, D. L., Tissue engineering of urethra using human vascular endothelial growth factor gene-modified bladder urothelial cells. *Artif. Organs* **2008,** 32, 91-99.
19. Bach, A. D.; Beier, J. P.; Stern-Staeter, J.; Horch, R. E., Skeletal muscle tissue engineering. *J. Cell. Mol. Med.* **2004,** 8, 413-422.
20. Levenberg, S.; Rouwkema, J.; Macdonald, M.; Garfein, E. S.; Kohane, D. S.; Darland, D. C.; Marini, R.; van Blitterswijk, C. A.; Mulligan, R. C.; D'Amore, P. A.; Langer, R., Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nat. Biotechnol.* **2005,** 23, 879-884.
21. Zakhem, E.; Raghavan, S.; Gilmont, R. R.; Bitar, K. N., Chitosan-based scaffolds for the support of smooth muscle constructs in intestinal tissue engineering. *Biomaterials* **2012,** 33, 4810-4817.
22. He, W.; Yong, T.; Teo, W. E.; Ma, Z. W.; Ramakrishna, S., Fabrication and endothelialization of collagen-blended biodegradable polymer nanofibers: Potential vascular graft for blood vessel tissue engineering. *Tissue Eng.* **2005,** 11, 1574-1588.
23. Balakrishnan, B.; Banerjee, R., Biopolymer-Based Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *Chem. Rev.* **2011,** 111, 4453-4474.
24. Hutmacher, D. W., Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* **2000,** 21, 2529-2543.
25. Suh, J. K. F.; Matthew, H. W. T., Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* **2000,** 21, 2589-2598.
26. Jang, J. H.; Castano, O.; Kim, H. W., Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009,** 61, 1065-1083.

27. Rezwan, K.; Chen, Q. Z.; Blaker, J. J.; Boccaccini, A. R., Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2006,** 27, 3413-3431.
28. Burg, K. J. L.; Porter, S.; Kellam, J. F., Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2000,** 21, 2347-2359.
29. LeGeros, R. Z.; LeGeros, J. P., *Calcium Phosphate Biomaterials: preparation, properties, and biodegradation.* Marcel Dekker: New-York, 1995; Vol. 2.
30. Vacanti, J. P.; Morse, M. A.; Saltzman, W. M.; Domb, A. J.; Perez-Atayde, A.; Langer, R., Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J. Pediatr. Surg.* **1988,** 23, 3-9.
31. Kuboki, Y.; Takita, H.; Kobayashi, D.; Tsuruga, E.; Inoue, M.; Murata, M.; Nagai, N.; Dohi, Y.; Ohgushi, H., BMP-Induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: Topology of osteogenesis. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998,** 39, 190-199.
32. Story, B. J.; Wagner, W. R.; Gaisser, D. M.; Cook, S. D., The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **1998,** 13, 749-757.
33. Akin, F. A.; Zreiqat, H.; Jordan, S.; Wijesundara, M. B. J.; Hanley, L., Preparation and analysis of macroporous TiO2 films on Ti surfaces for bone–tissue implants. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001,** 57, 588-596.
34. Karageorgiou, V.; Kaplan, D., Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* **2005,** 26, 5474-5491.
35. Sul, Y.-T.; Johansson, C. B.; Petronis, S.; Krozer, A.; Jeong, Y.; Wennerberg, A.; Albrektsson, T., Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown:: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition. *Biomaterials* **2002,** 23, 491-501.
36. Nishiguchi, S.; Kato, H.; Neo, M.; Oka, M.; Kim, H.-M.; Kokubo, T.; Nakamura, T., Alkali- and heat-treated porous titanium for orthopedic implants. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001,** 54, 198-208.
37. Pilliar, R. M., Overview of surface variability of metallic endosseous dental implants: textured and porous surface-structured designs. *Implant Dent.* **1998,** 7, 305-314.
38. van den Dolder, J.; Farber, E.; Spauwen, P. H. M.; Jansen, J. A., Bone tissue reconstruction using titanium fiber mesh combined with rat bone marrow stromal cells. *Biomaterials* **2003,** 24, 1745-1750.
39. Hulbert, S. F.; Young, F. A.; Mathews, R. S.; Klawitter, J. J.; Talbert, C. D.; Stelling, F. H., Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J. Biomed. Mater. Res.* **1970,** 4, 433-456.
40. Rubin, J. P.; Yaremchuk, M. J., Complications and Toxicities of Implantable Biomaterials Used in Facial Reconstructive and Aesthetic Surgery: A Comprehensive Review of the Literature. *Plast. Reconstr. Surg.* **1997,** 100, 1336-1353.
41. Whitters, C. J.; Strang, R.; Brown, D.; Clarke, R. L.; Curtis, R. V.; Hatton, P. V.; Ireland, A. J.; Lloyd, C. H.; McCabe, J. F.; Nicholson, J. W.; Scrimgeour, S. N.; Setcos, J. C.; Sherriff, M.; van Noort, R.; Watts, D. C.; Wood, D., Dental materials: 1997 literature review. *J. Dent.* **1999,** 27, 401-435.
42. Gladestone, H. B.; McDermott, M. W.; Cooke, D. D., Implants for cranioplasty. *Otolaryngol Clin North Am.* **1995,** 28, 381-400.
43. Knowles, J. C., Phosphate based glasses for biomedical applications. *J. Mater. Chem.* **2003,** 13, 2395-2401.
44. Brown, S.; Clarke, I.; Williams, P. In *Bioceramrics 14: Proceedings of the 14th international symposium on ceramics in medicine*, International symposium on ceramics in medicine, Palm Springs, CA, 2001; Palm Springs, CA, 2001; pp 213-269.
45. Habraken, W. J. E. M.; Wolke, J. G. C.; Jansen, J. A., Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007,** 59, 234-248.
46. Mastrogiacomo, M.; Scaglione, S.; Martinetti, R.; Dolcini, L.; Beltrame, F.; Cancedda, R.; Quarto, R., Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials* **2006,** 27, 3230-3237.
47. Almirall, A.; Larrecq, G.; Delgado, J. A.; Martínez, S.; Planell, J. A.; Ginebra, M. P., Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an α-TCP paste. *Biomaterials* **2004,** 25, 3671-3680.
48. Hench, L. L.; Anderson, O., An introduction to bioceramics. In 1969; pp 41-61.
49. Lobel, K. D.; Hench, L. L., In vitro adsorption and activity of enzymes on reaction layers of bioactive glass substrates. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998,** 39, 575-579.
50. Keshaw, H.; Forbes, A.; Day, R. M., Release of angiogenic growth factors from cells encapsulated in alginate beads with bioactive glass. *Biomaterials* **2005,** 26, 4171-4179.
51. Lu, H. H.; Tang, A.; Oh, S. C.; Spalazzi, J. P.; Dionisio, K., Compositional effects on the formation of a calcium phosphate layer and the response of osteoblast-like cells on polymer-bioactive glass composites. *Biomaterials* **2005,** 26, 6323-6334.

52. Roether, J. A.; Gough, J. E.; Boccaccini, A. R.; Hench, L. L.; Maquet, V.; Jérôme, R., Novel bioresorbable and bioactive composites based on bioactive glass and polylactide foams for bone tissue engineering. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2002,** 13, 1207-1214.
53. Puppi, D.; Chiellini, F.; Piras, A. M.; Chiellini, E., Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Prog. Polym. Sci.* **2010,** 35, 403-440.
54. Varghese, S.; Elisseeff, J., *Hydrogels for musculoskeletal tissue engineering*. Sprinter: Berlin, 2006; p 95-144.
55. Malafaya, P. B.; Silva, G. A.; Reis, R. L., Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007,** 59, 207-233.
56. Lee, C. H.; Singla, A.; Lee, Y., Biomedical applications of collagen. *Int. J. Pharm.* **2001,** 221, 1-22.
57. Yang, C.; Hillas, P. J.; Báez, J. A.; Nokelainen, M.; Balan, J.; Tang, J.; Spiro, R.; Polarek, J. W., The Application of Recombinant Human Collagen in Tissue Engineering. *BioDrugs* **2004,** 18, 103-119.
58. O'Brien, F. J.; Harley, B. A.; Yannas, I. V.; Gibson, L. J., The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* **2005,** 26, 433-441.
59. Zhong, S.; Teo, W. E.; Zhu, X.; Beuerman, R. W.; Ramakrishna, S.; Yung, L. Y. L., An aligned nanofibrous collagen scaffold by electrospinning and its effects on in vitro fibroblast culture. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2006,** 79A, 456-463.
60. Ferreira, A. M.; Gentile, P.; Chiono, V.; Ciardelli, G., Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomater.*
61. Schneider, R. K.; Puellen, A.; Kramann, R.; Raupach, K.; Bornemann, J.; Knuechel, R.; Pérez-Bouza, A.; Neuss, S., The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds. *Biomaterials* **2010,** 31, 467-480.
62. Angele, P.; Abke, J.; Kujat, R.; Faltermeier, H.; Schumann, D.; Nerlich, M.; Kinner, B.; Englert, C.; Ruszczak, Z.; Mehrl, R.; Mueller, R., Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. *Biomaterials* **2004,** 25, 2831-2841.
63. Han, I.; Shim, K. J.; Kim, J. Y.; Im, S. U.; Sung, Y. K.; Kim, M.; Kang, I.-K.; Kim, J. C., Effect of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Nanofiber Matrices Cocultured With Hair Follicular Epithelial and Dermal Cells for Biological Wound Dressing. *Artif. Organs* **2007,** 31, 801-808.
64. Woerly, S.; Marchand, R.; Lavallée, G., Interactions of copolymeric poly(glyceryl methacrylate)-collagen hydrogels with neural tissue: effects of structure and polar groups. *Biomaterials* **1991,** 12, 197-203.
65. Harriger, M. D.; Supp, A. P.; Warden, G. D.; Boyce, S. T., Glutaraldehyde crosslinking of collagen substrates inhibits degradation in skin substitutes grafted to athymic mice. *J. Biomed. Mater. Res.* **1997,** 35, 137-145.
66. Wissink, M. J. B.; Beernink, R.; Poot, A. A.; Engbers, G. H. M.; Beugeling, T.; van Aken, W. G.; Feijen, J., Relation between cell density and the secretion of von Willebrand factor and prostacyclin by human umbilical vein endothelial cells. *Biomaterials* **2001,** 22, 2283-2290.
67. Brinkman, W. T.; Nagapudi, K.; Thomas, B. S.; Chaikof, E. L., Photo-Cross-Linking of Type I Collagen Gels in the Presence of Smooth Muscle Cells: Mechanical Properties, Cell Viability, and Function. *Biomacromolecules* **2003,** 4, 890-895.
68. Elbjeirami, W. M.; Yonter, E. O.; Starcher, B. C.; West, J. L., Enhancing mechanical properties of tissue-engineered constructs via lysyl oxidase crosslinking activity. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2003,** 66A, 513-521.
69. Tabata, Y.; Ikada, Y., Protein release from gelatin matrices. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1998,** 31, 287-301.
70. Park, H.; Temenoff, J. S.; Holland, T. A.; Tabata, Y.; Mikos, A. G., Delivery of TGF-β1 and chondrocytes via injectable, biodegradable hydrogels for cartilage tissue engineering applications. *Biomaterials* **2005,** 26, 7095-7103.
71. Zhang, Y. Z.; Venugopal, J.; Huang, Z. M.; Lim, C. T.; Ramakrishna, S., Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers. *Polymer* **2006,** 47, 2911-2917.
72. Vepari, C.; Kaplan, D. L., Silk as a biomaterial. *Prog. Polym. Sci.* **2007,** 32, 991-1007.
73. Panilaitis, B.; Altman, G. H.; Chen, J.; Jin, H.-J.; Karageorgiou, V.; Kaplan, D. L., Macrophage responses to silk. *Biomaterials* **2003,** 24, 3079-3085.
74. Altman, G. H.; Diaz, F.; Jakuba, C.; Calabro, T.; Horan, R. L.; Chen, J.; Lu, H.; Richmond, J.; Kaplan, D. L., Silk-based biomaterials. *Biomaterials* **2003,** 24, 401-416.
75. Dal Pra, I.; Freddi, G.; Minic, J.; Chiarini, A.; Armato, U., De novo engineering of reticular connective tissue in vivo by silk fibroin nonwoven materials. *Biomaterials* **2005,** 26, 1987-1999.

76. Nishinari, K.; Takahashi, R., Interaction in polysaccharide solutions and gels. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2003,** 8, 396-400.
77. Cascone, M. G.; Barbani, N.; Cristallini, C.; Giusti, P.; Ciardelli, G.; Lazzeri, L., Bioartificial polymeric materials based on polysaccharides. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **2001,** 12, 267-281.
78. Venugopal, J.; Ramakrishna, S., Applications of polymer nanofibers in biomedicine and biotechnology. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2005,** 125, 147-157.
79. Khor, E.; Lim, L. Y., Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* **2003,** 24, 2339-2349.
80. Lee, K. Y.; Jeong, L.; Kang, Y. O.; Lee, S. J.; Park, W. H., Electrospinning of polysaccharides for regenerative medicine. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009,** 61, 1020-1032.
81. Schiffman, J. D.; Schauer, C. L., One-Step Electrospinning of Cross-Linked Chitosan Fibers. *Biomacromolecules* **2007,** 8, 2665-2667.
82. Malafaya, P. P.; Pedro, A. J.; Peterbauer, A.; Gabriel, C.; Redl, H.; Reis, R. L., Chitosan particles agglomerated scaffolds for cartilage and osteochondral tissue engineering approaches with adipose tissue derived stem cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2005,** 16, 1077-85.
83. Chen, S. C.; Wu, Y. C.; Mi, F. L.; Lin, Y. H.; Yu, L. C.; Sung, H. W., A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. *J. Controlled Release* **2004,** 96, 285-300.
84. Cai, X.; Tong, H.; Shen, X.; Chen, W.; Yan, J.; Hu, J., Preparation and characterization of homogeneous chitosan-polylactic acid/hydroxyapatite nanocomposite for bone tissue engineering and evaluation of its mechanical properties. *Acta Biomater.* **2009,** 5, 2693-2703.
85. Zhang, Y.; Zhang, M. Q., Microstructural and mechanical characterization of chitosan scaffolds reinforced by calcium phosphates. *J. Non-Cryst. Solids* **2001,** 282, 159-164.
86. Zhang, Y.; Venugopal, J. R.; El-Turki, A.; Ramakrishna, S.; Su, B.; Lim, C. T., Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2008,** 29, 4314-4322.
87. Zhang, Y.; Zhang, M. Q., Three-dimensional macroporous calcium phosphate bioceramics with nested chitosan sponges for load-bearing bone implants. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002,** 61, 1-8.
88. Dang, J. M.; Sun, D. D. N.; Shin-Ya, Y.; Sieber, A. N.; Kostuik, J. P.; Leong, K. W., Temperature-responsive hydroxybutyl chitosan for the culture of mesenchymal stem cells and intervertebral disk cells. *Biomaterials* **2006,** 27, 406-418.
89. Lee, Y. M.; Park, Y. J.; Lee, S. J.; Ku, Y.; Han, S. B.; Klokkevold, P. R.; Chung, C. P., The bone regenerative effect of platelet-derived growth factor-BB delivered with a chitosan/tricalcium phosphate sponge carrier. *J. Periodontol.* **2000,** 71, 418-424.
90. Liao, Y. H.; Jones, S. A.; Forbes, B.; Martin, G. P.; Brown, M. B., Hyaluronan: Pharmaceutical characterization and drug delivery. *Drug Delivery* **2005,** 12, 327-342.
91. Allison, D. D.; Grande-Allen, K. J., Review. Hyaluronan: A powerful tissue engineering tool. *Tissue Eng.* **2006,** 12, 2131-2140.
92. Campoccia, D.; Doherty, P.; Radice, M.; Brun, P.; Abatangelo, G.; Williams, D. F., Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomaterials* **1998,** 19, 2101-2127.
93. Ji, Y.; Ghosh, K.; Shu, X. Z.; Li, B.; Sokolov, J. C.; Prestwich, G. D.; Clark, R. A. F.; Rafailovich, M. H., Electrospun three-dimensional hyaluronic acid nanofibrous scaffolds. *Biomaterials* **2006,** 27, 3782-3792.
94. Wieland, J. A.; Houchin-Ray, T. L.; Shea, L. D., Non-viral vector delivery from PEG-hyaluronic acid hydrogels. *J. Controlled Release* **2007,** 120, 233-241.
95. Shu, X. Z.; Liu, Y. C.; Palumbo, F.; Prestwich, G. D., Disulfide-crosslinked hyaluronan-gelatin hydrogel films: a covalent mimic of the extracellular matrix for in vitro cell growth. *Biomaterials* **2003,** 24, 3825-3834.
96. Ghosh, K.; Ren, X. D.; Shu, X. Z.; Prestwich, G. D.; Clark, R. A. F., Fibronectin functional domains coupled to hyaluronan stimulate adult human dermal fibroblast responses critical for wound healing. *Tissue Eng.* **2006,** 12, 601-613.
97. Grigolo, B.; Lisignoli, G.; Piacentini, A.; Fiorini, M.; Gobbi, P.; Mazzotti, G.; Duca, M.; Pavesio, A.; Facchini, A., Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (HYAFF (R) 11): molecular, immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Biomaterials* **2002,** 23, 1187-1195.
98. Grigolo, B.; Roseti, L.; Fiorini, M.; Fini, M.; Giavaresi, G.; Aldini, N. N.; Giardino, R.; Facchini, A., Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (Hyaff (R)-11) into cartilage defects in rabbits. *Biomaterials* **2001,** 22, 2417-2424.

99. Lu, L.; Liu, X.; Tong, Z., GELATION IN ALGINATE SOLUTIONS AND ITS APPLICATIONS IN CARTILAGE TISSUE-ENGINEERING AND DRUG CONTROLLED RELEASE. *Acta Polymerica Sinica* **2010**, 1351-1358.
100. Li, Z. S.; Ramay, H. R.; Hauch, K. D.; Xiao, D. M.; Zhang, M. Q., Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2005,** 26, 3919-3928.
101. Li, Z. S.; Zhang, M. Q., Chitosan-alginate as scaffolding material for cartilage tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2005,** 75A, 485-493.
102. Hashimoto, T.; Suzuki, Y.; Tanihara, M.; Kakimaru, Y.; Suzuki, K., Development of alginate wound dressings linked with hybrid peptides derived from laminin and elastin. *Biomaterials* **2004,** 25, 1407-1414.
103. Chung, T. W.; Yang, J.; Akaike, T.; Cho, K. Y.; Nah, J. W.; Kim, S. I.; Cho, C. S., Preparation of alginate/galactosylated chitosan scaffold for hepatocyte attachment. *Biomaterials* **2002,** 23, 2827-2834.
104. Draget, K. I.; Ostgaard, K.; Smidsrod, O., HOMOGENEOUS ALGINATE GELS - A TECHNICAL APPROACH. *Carbohydr. Polym.* **1990,** 14, 159-178.
105. Xu, X. L.; Lou, J.; Tang, T. T.; Ng, K. W.; Zhang, J. H.; Yu, C. F.; Dai, K. R., Evaluation of different scaffolds for BMP-2 genetic orthopedic tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials* **2005,** 75B, 289-303.
106. Yoon, D. M.; Hawkins, E. C.; Francke-Carroll, S.; Fisher, J. P., Effect of construct properties on encapsulated chondrocyte expression of insulin-like growth factor-1. *Biomaterials* **2007,** 28, 299-306.
107. Park, D. J.; Choi, B. H.; Zhu, S. J.; Huh, J. Y.; Kim, B. Y.; Lee, S. H., Injectable bone using chitosan-alginate gel/mesenchymal stem cells/BMP-2 composites. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* **2005,** 33, 50-54.
108. de Chalain, T.; Phillips, J. H.; Hinek, A., Bioengineering of elastic cartilage with aggregated porcine and human auricular chondrocytes and hydrogels containing alginate, collagen, and kappa-elastin. *J. Biomed. Mater. Res.* **1999,** 44, 280-288.
109. Hutmacher, D. W., Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues - state of the art and future perspectives. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **2001,** 12, 107-124.
110. Nicodemus, G. D.; Bryant, S. J., Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Tissue Engineering Part B-Reviews* **2008,** 14, 149-165.
111. Levesque, S. G.; Lim, R. M.; Shoichet, M. S., Macroporous interconnected dextran scaffolds of controlled porosity for tissue-engineering applications. *Biomaterials* **2005,** 26, 7436-7446.
112. Liu, Y.; Chan-Park, M. B., A biomimetic hydrogel based on methacrylated dextran-graft-lysine and gelatin for 3D smooth muscle cell culture. *Biomaterials* **2010,** 31, 1158-1170.
113. Edman, P.; Ekman, B.; Sjoholm, I., IMMOBILIZATION OF PROTEINS IN MICROSPHERES OF BIODEGRADABLE POLYACRYLDEXTRAN. *J. Pharm. Sci.* **1980,** 69, 838-842.
114. Kim, S. H.; Won, C. Y.; Chu, C. C., Synthesis and characterization of dextran-based hydrogel prepared by photocrosslinking. *Carbohydr. Polym.* **1999,** 40, 183-190.
115. Klemm, D.; Schumann, D.; Udhardt, U.; Marsch, S., Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery. *Prog. Polym. Sci.* **2001,** 26, 1561-1603.
116. Czaja, W.; Krystynowicz, A.; Bielecki, S.; Brown, R. M., Microbial cellulose - the natural power to heal wounds. *Biomaterials* **2006,** 27, 145-151.
117. Helenius, G.; Backdahl, H.; Bodin, A.; Nannmark, U.; Gatenholm, P.; Risberg, B., In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2006,** 76A, 431-438.
118. Qi, H.; Hu, P.; Xu, J.; Wang, A., Encapsulation of drug reservoirs in fibers by emulsion electrospinning: Morphology characterization and preliminary release assessment. *Biomacromolecules* **2006,** 7, 2327-2330.
119. Bloch, K.; Lozinsky, V. I.; Galaev, I. Y.; Yavriyanz, K.; Vorobeychik, M.; Azarov, D.; Damshkaln, L. G.; Mattiasson, B.; Vardi, P., Functional activity of insulinoma cells (INS-1E) and pancreatic islets cultured in agarose cryogel sponges. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2005,** 75A, 802-809.
120. Torres, F. G.; Boccaccini, A. R.; Troncoso, O. P., Microwave processing of starch-based porous structures for tissue engineering scaffolds. *J. Appl. Polym. Sci.* **2007,** 103, 1332-1339.
121. Place, E. S.; George, J. H.; Williams, C. K.; Stevens, M. M., Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering. *Chem. Soc. Rev.* **2009,** 38, 1139-1151.
122. Jagur-Grodzinski, J., Biomedical application of functional polymers. *React. Funct. Polym.* **1999,** 39, 99-138.
123. Piskin, E.; Bolgen, N.; Egri, S.; Isoglu, I., Electrospun matrices made of poly(alpha-hydroxy acids) for medical use. *Nanomed.* **2007,** 2, 441-457.

124. Martin, C.; Winet, H.; Bao, J. Y., Acidity near eroding polylactide-polyglycolide in vitro and in vivo in rabbit tibial bone chambers. *Biomaterials* **1996,** 17, 2373-2380.
125. Heidemann, W.; Jeschkeit, S.; Ruffieux, K.; Fischer, J. H.; Wagner, M.; Krüger, G.; Wintermantel, E.; Gerlach, K. L., Degradation of poly(d,l)lactide implants with or without addition of calciumphosphates in vivo. *Biomaterials* **2001,** 22, 2371-2381.
126. Dunn, A. S.; Campbell, P. G.; Marra, K. G., The influence of polymer blend composition on the degradation of polymer/hydroxyapatite biomaterials. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **2001,** 12, 673-677.
127. Yang, S. F.; Leong, K. F.; Du, Z. H.; Chua, C. K., The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part 1. Traditional factors. *Tissue Eng.* **2001,** 7, 679-689.
128. Panseri, S.; Cunha, C.; Lowery, J.; Del Carro, U.; Taraballi, F.; Amadio, S.; Vescovi, A.; Gelain, F., Electrospun micro- and nanofiber tubes for functional nervous regeneration in sciatic nerve transections. *BMC Biotechnol.* **2008,** 8.
129. Wong, D. Y.; Hollister, S. J.; Krebsbach, P. H.; Nosrat, C., Poly(epsilon-caprolactone) and poly (L-lactic-co-glycolic acid) degradable polymer sponges attenuate astrocyte response and lesion growth in acute traumatic brain injury. *Tissue Eng.* **2007,** 13, 2515-2523.
130. Tillman, B. W.; Yazdani, S. K.; Lee, S. J.; Geary, R. L.; Atala, A.; Yoo, J. J., The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction. *Biomaterials* **2009,** 30, 583-588.
131. Lee, S. J.; Liu, J.; Oh, S. H.; Soker, S.; Atala, A.; Yoo, J. J., Development of a composite vascular scaffolding system that withstands physiological vascular conditions. *Biomaterials* **2008,** 29, 2891-2898.
132. Lei, Y.; Rai, B.; Ho, K. H.; Teoh, S. H., In vitro degradation of novel bioactive polycaprolactone-20% tricalcium phosphate composite scaffolds for bone engineering. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems* **2007,** 27, 293-298.
133. Gupta, D.; Venugopal, J.; Mitra, S.; Giri Dev, V. R.; Ramakrishna, S., Nanostructured biocomposite substrates by electrospinning and electrospraying for the mineralization of osteoblasts. *Biomaterials* **2009,** 30, 2085-2094.
134. Heo, S. J.; Kim, S. E.; Wei, J.; Kim, D. H.; Hyun, Y. T.; Yun, H. S.; Kim, H. K.; Yoon, T. R.; Kim, S. H.; Park, S. A.; Shin, J. W., In Vitro and Animal Study of Novel Nano-Hydroxyapatite/Poly(epsilon-Caprolactone) Composite Scaffolds Fabricated by Layer Manufacturing Process. *Tissue Engineering Part A* **2009,** 15, 977-989.
135. Erisken, C.; Kalyon, D. M.; Wang, H. J., Functionally graded electrospun polycaprolactone and beta-tricalcium phosphate nanocomposites for tissue engineering applications. *Biomaterials* **2008,** 29, 4065-4073.
136. Savarino, L.; Baldini, N.; Greco, M.; Capitani, O.; Pinna, S.; Valentini, S.; Lombardo, B.; Esposito, M. T.; Pastore, L.; Ambrosio, L.; Battista, S.; Causa, F.; Zeppetelli, S.; Guarino, V.; Netti, P. A., The performance of poly-ε-caprolactone scaffolds in a rabbit femur model with and without autologous stromal cells and BMP4. *Biomaterials* **2007,** 28, 3101-3109.
137. Li, W.-J.; Tuli, R.; Huang, X.; Laquerriere, P.; Tuan, R. S., Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials* **2005,** 26, 5158-5166.
138. Li, W.-J.; Tuli, R.; Okafor, C.; Derfoul, A.; Danielson, K. G.; Hall, D. J.; Tuan, R. S., A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **2005,** 26, 599-609.
139. Shalumon, K. T.; Sathish, D.; Nair, S. V.; Chennazhi, K. P.; Tamura, H.; Jayakumar, R., Fabrication of Aligned Poly(Lactic Acid)-Chitosan Nanofibers by Novel Parallel Blade Collector Method for Skin Tissue Engineering. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2012,** 8, 405-416.
140. Kumbar, S. G.; Nukavarapu, S. P.; James, R.; Nair, L. S.; Laurencin, C. T., Electrospun poly(lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials* **2008,** 29, 4100-4107.
141. Yang, F.; Murugan, R.; Wang, S.; Ramakrishna, S., Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials* **2005,** 26, 2603-2610.
142. Jiang, T.; Abdel-Fattah, W. I.; Laurencin, C. T., In vitro evaluation of chitosan/poly(lactic acid-glycolic acid) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2006,** 27, 4894-4903.
143. Jung, Y.; Kim, S. S.; Kim, Y. H.; Kim, S. H.; Kim, B. S.; Kim, S.; Choi, C. Y., A poly(lactic acid)/calcium metaphosphate composite for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2005,** 26, 6314-6322.
144. Kim, H. W.; Lee, H. H.; Chun, G. S., Bioactivity and osteoblast responses of novel biomedical nanocomposites of bioactive glass nanofiber filled poly(lactic acid). *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2008,** 85A, 651-663.

145. Kim, H. W.; Lee, H. H.; Knowles, J. C., Electrospinning biomedical nanocomposite fibers of hydroxyapaite/poly(lactic acid) for bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2006,** 79A, 643-649.
146. Yao, J.; Radin, S.; Leboy, P. S.; Ducheyne, P., The effect of bioactive glass content on synthesis and bioactivity of composite poly (lactic-co-glycolic acid)/bioactive glass substrate for tissue engineering. *Biomaterials* **2005,** 26, 1935-1943.
147. Han, J.; Lazarovici, P.; Pomerantz, C.; Chen, X.; Wei, Y.; Lelkes, P. I., Co-Electrospun Blends of PLGA, Gelatin, and Elastin as Potential Nonthrombogenic Scaffolds for Vascular Tissue Engineering. *Biomacromolecules* **2010,** 12, 399-408.
148. Stitzel, J.; Liu, J.; Lee, S. J.; Komura, M.; Berry, J.; Soker, S.; Lim, G.; Van Dyke, M.; Czerw, R.; Yoo, J. J.; Atala, A., Controlled fabrication of a biological vascular substitute. *Biomaterials* **2006,** 27, 1088-1094.
149. Prabhakaran, M. P.; Venugopal, J.; Ramakrishna, S., Electrospun nanostructured scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* **2009,** 5, 2884-2893.
150. Wei, G.; Jin, Q.; Giannobile, W. V.; Ma, P. X., The enhancement of osteogenesis by nano-fibrous scaffolds incorporating rhBMP-7 nanospheres. *Biomaterials* **2007,** 28, 2087-2096.
151. Niu, X.; Feng, Q.; Wang, M.; Guo, X.; Zheng, Q., Porous nano-HA/collagen/PLLA scaffold containing chitosan microspheres for controlled delivery of synthetic peptide derived from BMP-2. *J. Controlled Release* **2009,** 134, 111-117.
152. Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y., Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* **2000,** 25, 1503-1555.
153. Zinn, M.; Witholt, B.; Egli, T., Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001,** 53, 5-21.
154. Chanprateep, S., Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Biosci. Bioeng.* **2010,** 110, 621-632.
155. Poirier, Y.; Nawrath, C.; Somerville, C., Production of Polyhydroxyalkanoates, a Family of Biodegradable Plastics and Elastomers, in Bacteria and Plants. *Nat Biotech* **1995,** 13, 142-150.
156. Chen, G.-Q.; Wu, Q., The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* **2005,** 26, 6565-6578.
157. Langlois, V.; Renard, E.; Vergnol, G.; Guerin, P.; Loirand, G.; Haroun, F.; Seron, A., Elaboration of biodegradable systems for electrografting onto endovascular metallic stents. *IRBM* **2010,** 31, 111-114.
158. Deng, Y.; Zhao, K.; Zhang, X.-f.; Hu, P.; Chen, G.-Q., Study on the three-dimensional proliferation of rabbit articular cartilage-derived chondrocytes on polyhydroxyalkanoate scaffolds. *Biomaterials* **2002,** 23, 4049-4056.
159. Deng, Y.; Lin, X.-S.; Zheng, Z.; Deng, J.-G.; Chen, J.-C.; Ma, H.; Chen, G.-Q., Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) promoted production of extracellular matrix of articular cartilage chondrocytes in vitro. *Biomaterials* **2003,** 24, 4273-4281.
160. Asran, A. S.; Razghandi, K.; Aggarwal, N.; Michler, G. H.; Groth, T., Nanofibers from Blends of Polyvinyl Alcohol and Polyhydroxy Butyrate As Potential Scaffold Material for Tissue Engineering of Skin. *Biomacromolecules* **2010,** 11, 3413-3421.
161. Sodian, R.; Hoerstrup, S. P.; Sperling, J. S.; Daebritz, S.; Martin, D. P.; Moran, A. M.; Kim, B. S.; Schoen, F. J.; Vacanti, J. P.; Mayer, J. E., Early in vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart valves. *Circulation* **2000,** 102, 22-29.
162. Hazer, D. B.; Kılıçay, E.; Hazer, B., Poly(3-hydroxyalkanoate)s: Diversification and biomedical applications: A state of the art review. *Materials Science and Engineering: C* **2012,** 32, 637-647.
163. Serrano, M. C.; Chung, E. J.; Ameer, G. A., Advances and Applications of Biodegradable Elastomers in Regenerative Medicine. *Adv. Funct. Mater.* **2010,** 20, 192-208.
164. Wang, L.; Wang, Z.-H.; Shen, C.-Y.; You, M.-L.; Xiao, J.-F.; Chen, G.-Q., Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells grown in terpolyesters of 3-hydroxyalkanoates scaffolds into nerve cells. *Biomaterials* **2010,** 31, 1691-1698.
165. Bian, Y.-Z.; Wang, Y.; Aibaidoula, G.; Chen, G.-Q.; Wu, Q., Evaluation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* **2009,** 30, 217-225.
166. Misra, S. K.; Valappil, S. P.; Roy, I.; Boccaccini, A. R., Polyhydroxyalkanoate (PHA)/Inorganic Phase Composites for Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules* **2006,** 7, 2249-2258.
167. Doyle, C.; Tanner, E. T.; Bonfield, W., In vitro and in vivo evaluation of polyhydroxybutyrate and of polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite. *Biomaterials* **1991,** 12, 841-847.
168. Kose, G. T.; Korkusuz, F.; Korkusuz, P.; Hasirci, V., In vivo tissue engineering of bone using poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) and collagen scaffolds. *Tissue Eng.* **2004,** 10, 1234-1250.

169. Mai, R.; Hagedorn, M. G.; Gelinsky, M.; Werner, C.; Turhani, D.; Spath, H.; Gedrange, T.; Lauer, G., Ectopic bone formation in nude rats using human osteoblasts seeded poly(3)hydroxybutyrate embroidery and hydroxyapatite-collagen tapes constructs. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* **2006,** 34, 101-109.
170. Cool, S. M.; Kenny, B.; Wu, A.; Nurcombe, V.; Trau, M.; Cassady, A. I.; Grondahl, L., Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) composite biomaterials for bone tissue regeneration: In vitro performance assessed by osteoblast proliferation, osteoclast adhesion and resorption, and macrophage proinflammatory response. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2007,** 82A, 599-610.
171. Xi, J.; Zhang, L.; Zheng, Z. H.; Chen, G. Q.; Gong, Y. D.; Zhao, N. M.; Zhang, X. F., Preparation and evaluation of porous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)-hydroxyapatite composite scaffolds. *J. Biomater. Appl.* **2008,** 22, 293-307.
172. Luklinska, Z. B.; Schluckwerder, H., In vivo response to HA-polyhydroxybutyrate/polyhydroxyvalerate composite. *Journal of Microscopy-Oxford* **2003,** 211, 121-129.
173. Misra, S. K.; Nazhat, S. N.; Valappil, S. P.; Moshrefi-Torbati, M.; Wood, R. J. K.; Roy, I.; Boccaccini, A. R., Fabrication and Characterization of Biodegradable Poly(3-hydroxybutyrate) Composite Containing Bioglass. *Biomacromolecules* **2007,** 8, 2112-2119.
174. Guelcher, S. A., Biodegradable polyurethanes: Synthesis and applications in regenerative medicine. *Tissue Engineering Part B-Reviews* **2008,** 14, 3-17.
175. Peter, S. J.; Lu, L.; Kim, D. J.; Stamatas, G. N.; Miller, M. J.; Yaszemski, M. J.; Mikos, A. G., Effects of transforming growth factor beta 1 released from biodegradable polymer microparticles on marrow stromal osteoblasts cultured on poly(propylene fumarate) substrates. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000,** 50, 452-462.
176. Ambrosio, A. M. A.; Allcock, H. R.; Katti, D. S.; Laurencin, C. T., Degradable polyphosphazene/poly(α-hydroxyester) blends: degradation studies. *Biomaterials* **2002,** 23, 1667-1672.
177. Neamnark, A.; Sanchavanakit, N.; Pavasant, P.; Rujiravanit, R.; Supaphol, P., In vitro biocompatibility of electrospun hexanoyl chitosan fibrous scaffolds towards human keratinocytes and fibroblasts. *Eur. Polym. J.* **2008,** 44, 2060-2067.
178. Kjaer, M., Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol. Rev.* **2004,** 84, 649-698.
179. Carrion, B.; Huang, C. P.; Ghajar, C. M.; Kachgal, S.; Kniazeva, E.; Jeon, N. L.; Putnam, A. J., Recreating the Perivascular Niche Ex Vivo Using a Microfluidic Approach. *Biotechnol. Bioeng.* **2010,** 107, 1020-1028.
180. Yin, Z.; Chen, X.; Chen, J. L.; Shen, W. L.; Hieu Nguyen, T. M.; Gao, L.; Ouyang, H. W., The regulation of tendon stem cell differentiation by the alignment of nanofibers. *Biomaterials* **2010,** 31, 2163-2175.
181. Bhardwaj, T.; Pilliar, R. M.; Grynpas, M. D.; Kandel, R. A., Effect of material geometry on cartilagenous tissue formation in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001,** 57, 190-199.
182. Laurencin, C. T.; Lu, H. H.; Y, K., *Processing of polymers scaffolds: polymer-ceramic composite foams*. California Academic press: 2002.
183. Thomson, R. C.; Yaszemski, M. J.; Powers, J. M.; Mikos, A. G., Hydroxyapatite fiber reinforced poly(alpha-hydroxy ester) foams for bone regeneration. *Biomaterials* **1998,** 19, 1935-1943.
184. Aho, A. J.; Tirri, T.; Kukkonen, J.; Strandberg, N.; Rich, J.; Seppala, J.; Yli-Urpo, A., Injectable bioactive glass/biodegradable polymer composite for bone and cartilage reconstruction: Concept and experimental outcome with thermoplastic composites of poly(epsilon-caprolactone-CO-D,L-lactide) and bioactive glass S53P4. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **2004,** 15, 1165-1173.
185. Miralles, G.; Baudoin, R.; Dumas, D.; Baptiste, D.; Hubert, P.; Stoltz, J. F.; Dellacherie, E.; Mainard, D.; Netter, P.; Payan, E., Sodium alginate sponges with or without sodium hyaluronate: In vitro engineering of cartilage. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001,** 57, 268-278.
186. Xia, W. Y.; Liu, W.; Cui, L.; Liu, Y. C.; Zhong, W.; Liu, D. L.; Wu, J. J.; Chua, K. H.; Cao, Y. L., Tissue engineering of cartilage with the use of chitosan-gelatin complex scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials* **2004,** 71B, 373-380.
187. Mikos, A. G.; Thorsen, A. J.; Czerwonka, L. A.; Bao, Y.; Langer, R.; Winslow, D. N.; Vacanti, J. P., PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF POLY(L-LACTIC ACID) FOAMS. *Polymer* **1994,** 35, 1068-1077.
188. Mikos, A. G.; Sarakinos, G.; Leite, S. M.; Vacanti, J. P.; Langer, R., LAMINATED 3-DIMENSIONAL BIODEGRADABLE FOAMS FOR USE IN TISSUE ENGINEERING. *Biomaterials* **1993,** 14, 323-330.
189. Pikal, M. J.; Shah, S.; Roy, M. L.; Putman, R., THE SECONDARY DRYING STAGE OF FREEZE-DRYING - DRYING KINETICS AS A FUNCTION OF TEMPERATURE AND CHAMBER PRESSURE. *Int. J. Pharm.* **1990,** 60, 203-217.
190. Liapis, A. I.; Bruttini, R., A THEORY FOR THE PRIMARY AND SECONDARY DRYING STAGES OF THE FREEZE-DRYING OF PHARMACEUTICAL CRYSTALLINE AND AMORPHOUS SOLUTES - COMPARISON BETWEEN EXPERIMENTAL-DATA AND THEORY. *Separations Technology* **1994,** 4, 144-155.

191. Thomson, R. C.; Shung, A. K.; Yaszemski, M. J.; Mikos, A. G., Polymer scaffold processing. In *Principles of tissue engineering*, Lanza, R. P.; Langer, R.; Vacanti, J. P., Eds. Academic press: San Diego, 2000; pp 251-262.
192. Dagalakis, N.; Flink, J.; Stasikelis, P.; Burke, J. F.; Yannas, I. V., DESIGN OF AN ARTIFICIAL SKIN .3. CONTROL OF PORE STRUCTURE. *J. Biomed. Mater. Res.* **1980,** 14, 511-528.
193. Quirk, R. A.; France, R. M.; Shakesheff, K. M.; Howdle, S. M., Supercritical fluid technologies and tissue engineering scaffolds. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **2004,** 8, 313-321.
194. Cooper, A. I., Porous Materials and Supercritical Fluids. *Adv. Mater.* **2003,** 15, 1049-1059.
195. Murphy, W. L.; Peters, M. C.; Kohn, D. H.; Mooney, D. J., Sustained release of vascular endothelial growth factor from mineralized poly(lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* **2000,** 21, 2521-2527.
196. Mooney, D. J.; Baldwin, D. F.; Suh, N. P.; Vacanti, L. P.; Langer, R., Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials* **1996,** 17, 1417-1422.
197. Lee, K. W. D.; Chan, P. K.; Feng, X. S., Morphology development and characterization of the phase-separated structure resulting from the thermal-induced phase separation phenomenon in polymer solutions under a temperature gradient. *Chem. Eng. Sci.* **2004,** 59, 1491-1504.
198. Maquet, V.; Boccaccini, A. R.; Pravata, L.; Notingher, I.; Jerome, R., Preparation, characterization, and in vitro degradation of bioresorbable and bioactive composites based on Bioglass (R)-filled polylactide foams. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2003,** 66A, 335-346.
199. Day, R. M.; Boccaccin, A. R.; Maquet, V.; Shurey, S.; Forbes, A.; Gabe, S. M.; Jerome, R., In vivo characterisation of a novel bioresorbable poly(lactide-co-glycolide) tubular foam scaffold for tissue engineering applications. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **2004,** 15, 729-734.
200. Maquet, V.; Boccaccini, A. R.; Pravata, L.; Notingher, I.; Jérôme, R., Porous poly(α-hydroxyacid)/Bioglass® composite scaffolds for bone tissue engineering. I: preparation and in vitro characterisation. *Biomaterials* **2004,** 25, 4185-4194.
201. Chung, C.; Burdick, J. A., Engineering cartilage tissue. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008,** 60, 243-262.
202. Bryant, S. J.; Anseth, K. S., Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002,** 59, 63-72.
203. Kloczkowski, A., Application of statistical mechanics to the analysis of various physical properties of elastomeric networks — a review. *Polymer* **2002,** 43, 1503-1525.
204. Van Vlierberghe, S.; Fritzinger, B.; Martins, J. C.; Dubruel, P., Hydrogel Network Formation Revised: High-Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance as a Powerful Tool for Measuring Absolute Hydrogel Cross-Link Efficiencies. *Appl. Spectrosc.* **2010,** 64, 1176-1180.
205. Van Vlierberghe, S.; Dubruel, P.; Schacht, E., Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Biomacromolecules* **2011,** 12, 1387-1408.
206. Inoue, T.; Osaki, K., Rheological properties of poly(vinyl alcohol)/sodium borate aqueous solutions. *Rheol. Acta* **1993,** 32, 550-555.
207. Schacht, E.; Toncheva, V.; Vandertaelen, K.; Heller, J., Polyacetal and poly(ortho ester)-poly(ethylene glycol) graft copolymer thermogels: Preparation, hydrolysis and FITC-BSA release studies. *J. Controlled Release* **2006,** 116, 219-225.
208. Brazel, C. S.; Peppas, N. A., Pulsatile local delivery of thrombolytic and antithrombotic agents using poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) hydrogels. *J. Controlled Release* **1996,** 39, 57-64.
209. Wang, T. W.; Spector, M., Development of hyaluronic acid-based scaffolds for brain tissue engineering. *Acta Biomater.* **2009,** 5, 2371-2384.
210. Wang, T. W.; Sun, J. S.; Wu, H. C.; Tsuang, Y. H.; Wang, W. H.; Lin, F. H., The effect of gelatin-chondroitin sulfate-hyaluronic acid skin substitute on wound healing in SCID mice. *Biomaterials* **2006,** 27, 5689-5697.
211. Duan, X. D.; McLaughlin, C.; Griffith, M.; Sheardown, H., Biofunctionalization of collagen for improved biological response: Scaffolds for corneal tissue engineering. *Biomaterials* **2007,** 28, 78-88.
212. Khademhosseini, A.; Eng, G.; Yeh, J.; Fukuda, J.; Blumling, J.; Langer, R.; Burdick, J. A., Micromolding of photocrosslinkable hyaluronic acid for cell encapsulation and entrapment. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2006,** 79A, 522-532.
213. Zawko, S. A.; Suri, S.; Truong, Q.; Schmidt, C. E., Photopatterned anisotropic swelling of dual-crosslinked hyaluronic acid hydrogels. *Acta Biomater.* **2009,** 5, 14-22.
214. Horn, E. M.; Beaumont, M.; Shu, X. Z.; Harvey, A.; Prestwich, G. D.; Horn, K. M.; Gibson, A. R.; Preul, M. C.; Panitch, A., Influence of cross-linked hyaluronic acid hydrogels on neurite outgrowth and recovery from spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery-Spine* **2007,** 6, 133-140.

215. Jayakrishnan, A.; Jameela, S. R., Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. *Biomaterials* **1996,** 17, 471-484.
216. Olde Damink, L. H. H.; Dijkstra, P. J.; Luyn, M. J. A.; Wachem, P. B.; Nieuwenhuis, P.; Feijen, J., Crosslinking of dermal sheep collagen using hexamethylene diisocyanate. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **1995,** 6, 429-434.
217. Lien, S. M.; Ko, L. Y.; Huang, T. J., Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomater.* **2009,** 5, 670-679.
218. Gong, Y. H.; Zhu, Y. B.; Liu, Y. X.; Ma, Z. W.; Gao, C. Y.; Shen, J. C., Layer-by-layer assembly of chondroitin sulfate and collagen on aminolyzed pOly(L-lactic acid) porous scaffolds to enhance their chondrogenesis. *Acta Biomater.* **2007,** 3, 677-685.
219. Wen, F.; Chang, S.; Toh, Y. C.; Teoh, S. H.; Yu, H., Development of poly (lactic-co-glycolic acid)-collagen scaffolds for tissue engineering. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems* **2007,** 27, 285-292.
220. Beachley, V.; Wen, X., Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. *Prog. Polym. Sci.* **2010,** 35, 868-892.
221. Tuzlakoglu, K.; Alves, C. M.; Mano, J. F.; Reis, R. L., Production and characterization of chitosan fibers and 3-D fiber mesh scaffolds for tissue engineering applications. *Macromol. Biosci.* **2004,** 4, 811-819.
222. Williamson, M. R.; Coombes, A. G. A., Gravity spinning of polycaprolactone fibres for applications in tissue engineering. *Biomaterials* **2004,** 25, 459-465.
223. Crow, B. B.; Borneman, A. F.; Hawkins, D. L.; Smith, G. M.; Nelson, K. D., Evaluation of in vitro drug release, pH change, and molecular weight degradation of poly(L-lactic acid) and poly(D, L-lactide-co-glycolide) fibers. *Tissue Eng.* **2005,** 11, 1077-1084.
224. Huang, Z. M.; Zhang, Y. Z.; Kotaki, M.; Ramakrishna, S., A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology* **2003,** 63, 2223-2253.
225. Li, D.; Xia, Y. N., Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel? *Adv. Mater.* **2004,** 16, 1151-1170.
226. Lim, S. H.; Mao, H.-Q., Electrospun scaffolds for stem cell engineering. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009,** 61, 1084-1096.
227. Pham, Q. P.; Sharma, U.; Mikos, A. G., Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: A review. *Tissue Eng.* **2006,** 12, 1197-1211.
228. Matthews, J. A.; Wnek, G. E.; Simpson, D. G.; Bowlin, G. L., Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules* **2002,** 3, 232-238.
229. Huang, Z. M.; Zhang, Y. Z.; Ramakrishna, S.; Lim, C. T., Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers. *Polymer* **2004,** 45, 5361-5368.
230. Geng, X. Y.; Kwon, O. H.; Jang, J. H., Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials* **2005,** 26, 5427-5432.
231. Ignatova, M.; Manolova, N.; Rashkov, I., Novel antibacterial fibers of quaternized chitosan and poly(vinyl pyrrolidone) prepared by electrospinning. *Eur. Polym. J.* **2007,** 43, 1112-1122.
232. Luu, Y. K.; Kim, K.; Hsiao, B. S.; Chu, B.; Hadjiargyrou, M., Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers. *J. Controlled Release* **2003,** 89, 341-353.
233. Smith, L. A.; Liu, X.; Hu, J.; Ma, P. X., The influence of three-dimensional nanofibrous scaffolds on the osteogenic differentiation of embryonic stem cells. *Biomaterials* **2009,** 30, 2516-2522.
234. Pham, Q. P.; Sharma, U.; Mikos, A. G., Electrospun poly(epsilon-caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: Characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. *Biomacromolecules* **2006,** 7, 2796-2805.
235. Ma, P. X., Biomimetic materials for tissue engineering. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008,** 60, 184-198.
236. Li, W.-J.; Laurencin, C. T.; Caterson, E. J.; Tuan, R. S.; Ko, F. K., Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002,** 60, 613-621.
237. Prabhakaran, M. P.; Venugopal, J. R.; Ramakrishna, S., Mesenchymal stem cell differentiation to neuronal cells on electrospun nanofibrous substrates for nerve tissue engineering. *Biomaterials* **2009,** 30, 4996-5003.
238. Ravichandran, R.; Venugopal, J. R.; Sundarrajan, S.; Mukherjee, S.; Ramakrishna, S., Precipitation of nanohydroxyapatite on PLLA/PBLG/Collagen nanofibrous structures for the differentiation of adipose derived stem cells to osteogenic lineage. *Biomaterials* **2012,** 33, 846-855.
239. Rayleigh, L., XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *Philosophical Magazine Series 5* **1882,** 14, 184-186.

240. Morton, W. J. 1902.
241. Cooley, J. F. 1903.
242. Formhals, A. 1934.
243. Jacobsen, A., *Chemiefasern/textilind.* **1991**, 36-41.
244. Reneker, D. H.; Yarin, A. L., Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer* **2008,** 49, 2387-2425.
245. Reneker, D. H.; Chun, I., Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology* **1996,** 7, 216-223.
246. Greiner, A.; Wendorff, J. H., Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibres. *Angewandte Chemie-International Edition* **2007,** 46, 5670-5703.
247. Bhardwaj, N.; Kundu, S. C., Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* **2010,** 28, 325-347.
248. Reneker, D. H.; Yarin, A. L.; Fong, H.; Koombhongse, S., Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *J. Appl. Phys.* **2000,** 87, 4531-4547.
249. Ramakrishna, S.; Fujihara, K.; Teo, W.-E.; Yong, T.; Ma, Z.; Ramaseshan, R., Electrospun nanofibers: solving global issues. *Materials Today* **2006,** 9, 40-50.
250. Agarwal, S.; Wendorff, J. H.; Greiner, A., Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* **2008,** 49, 5603-5621.
251. Kim, G.; Cho, Y.-S.; Kim, W. D., Stability analysis for multi jets electrospinning process modified with a cylindrical electrode. *Eur. Polym. J.* **2006,** 42, 2031-2038.
252. Dosunmu, O. O.; Chase, G. G.; Kataphinan, W.; Reneker, D. H., Electrospinning of polymer nanofibres from multiple jets on a porous tubular surface. *Nanotechnology* **2006,** 17, 1123-1127.
253. Jiang, H. L.; Hu, Y. Q.; Li, Y.; Zhao, P. C.; Zhu, K. J.; Chen, W. L., A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents. *J. Controlled Release* **2005,** 108, 237-243.
254. Li, D.; Xia, Y. N., Direct fabrication of composite and ceramic hollow nanofibers by electrospinning. *Nano Lett.* **2004,** 4, 933-938.
255. Sun, Z. C.; Zussman, E.; Yarin, A. L.; Wendorff, J. H.; Greiner, A., Compound core-shell polymer nanofibers by co-electrospinning. *Adv. Mater.* **2003,** 15, 1929-+.
256. Zhang, Y. Z.; Wang, X.; Feng, Y.; Li, J.; Lim, C. T.; Ramakrishna, S., Coaxial electrospinning of (fluorescein isothiocyanate-conjugated bovine serum albumin)-encapsulated poly(epsilon-caprolactone) nanofibers for sustained release. *Biomacromolecules* **2006,** 7, 1049-1057.
257. Yarin, A. L.; Koombhongse, S.; Reneker, D. H., Bending instability in electrospinning of nanofibers. *J. Appl. Phys.* **2001,** 89, 3018-3026.
258. Shenoy, S. L.; Bates, W. D.; Frisch, H. L.; Wnek, G. E., Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: good solvent, non-specific polymer–polymer interaction limit. *Polymer* **2005,** 46, 3372-3384.
259. Fong, H.; Chun, I.; Reneker, D. H., Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer* **1999,** 40, 4585-4592.
260. Sill, T. J.; von Recum, H. A., Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* **2008,** 29, 1989-2006.
261. Megelski, S.; Stephens, J. S.; Chase, D. B.; Rabolt, J. F., Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers. *Macromolecules* **2002,** 35, 8456-8466.
262. Lin, T.; Wang, H. X.; Wang, H. M.; Wang, X. G., The charge effect of cationic surfactants on the elimination of fibre beads in the electrospinning of polystyrene. *Nanotechnology* **2004,** 15, 1375-1381.
263. Demir, M. M.; Yilgor, I.; Yilgor, E.; Erman, B., Electrospinning of polyurethane fibers. *Polymer* **2002,** 43, 3303-3309.
264. Deitzel, J. M.; Kleinmeyer, J.; Harris, D.; Tan, N. C. B., The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer* **2001,** 42, 261-272.
265. Zuo, W. W.; Zhu, M. F.; Yang, W.; Yu, H.; Chen, Y. M.; Zhang, Y., Experimental study on relationship between jet instability and formation of beaded fibers during electrospinning. *Polym. Eng. Sci.* **2005,** 45, 704-709.
266. Lee, J. S.; Choi, K. H.; Do Ghim, H.; Kim, S. S.; Chun, D. H.; Kim, H. Y.; Lyoo, W. S., Role of molecular weight of atactic poly(vinyl alcohol) (PVA) in the structure and properties of PVA nanofabric prepared by electrospinning. *J. Appl. Polym. Sci.* **2004,** 93, 1638-1646.
267. Doshi, J.; Reneker, D. H., ELECTROSPINNING PROCESS AND APPLICATIONS OF ELECTROSPUN FIBERS. *Journal of Electrostatics* **1995,** 35, 151-160.
268. Kim, T. G.; Shin, H.; Lim, D. W., Biomimetic Scaffolds for Tissue Engineering. *Adv. Funct. Mater.* **2012,** 22, 2446-2468.

269. Yoo, H. S.; Kim, T. G.; Park, T. G., Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009,** 61, 1033-1042.
270. Seyedjafari, E.; Soleimani, M.; Ghaemi, N.; Shabani, I., Nanohydroxyapatite-Coated Electrospun Poly(l-lactide) Nanofibers Enhance Osteogenic Differentiation of Stem Cells and Induce Ectopic Bone Formation. *Biomacromolecules* **2010,** 11, 3118-3125.
271. Yang, F.; Wolke, J. G. C.; Jansen, J. A., Biomimetic calcium phosphate coating on electrospun poly (epsilon-caprolactone) scaffolds for bone tissue engineering. *Chem. Eng. J. (Lausanne)* **2008,** 137, 154-161.
272. Ladizesky, N. H.; Ward, I. M., A REVIEW OF PLASMA TREATMENT AND THE CLINICAL-APPLICATION OF POLYETHYLENE FIBERS TO REINFORCEMENT OF ACRYLIC RESINS. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **1995,** 6, 497-504.
273. Baek, H. S.; Park, Y. H.; Ki, C. S.; Park, J. C.; Rah, D. K., Enhanced chondrogenic responses of articular chondrocytes onto porous silk fibroin scaffolds treated with microwave-induced argon plasma. *Surf. Coat. Technol.* **2008,** 202, 5794-5797.
274. He, W.; Ma, Z. W.; Yong, T.; Teo, W. E.; Ramakrishna, S., Fabrication of collagen-coated biodegradable polymer nanofiber mesh and its potential for endothelial cells growth. *Biomaterials* **2005,** 26, 7606-7615.
275. Sun, H.; Onneby, S., Facile polyester surface functionalization via hydrolysis and cell-recognizing peptide attachment. *Polym. Int.* **2006,** 55, 1336-1340.
276. Croll, T. I.; O'Connor, A. J.; Stevens, G. W.; Cooper-White, J. J., Controllable surface modification of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) by hydrolysis or aminolysis I: Physical, chemical, and theoretical aspects. *Biomacromolecules* **2004,** 5, 463-473.
277. Zhu, Y. B.; Leong, M. F.; Ong, W. F.; Chan-Park, M. B.; Chian, K. S., Esophageal epithelium regeneration on fibronectin grafted poly(L-lactide-co-caprolactone) (PLLC) nanofiber scaffold. *Biomaterials* **2007,** 28, 861-868.
278. Nisbet, D. R.; Yu, L. M. Y.; Zahir, T.; Forsythe, J. S.; Shoichet, M. S., Characterization of neural stem cells on electrospun poly(epsilon-caprolactone) submicron scaffolds: evaluating their potential in neural tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **2008,** 19, 623-634.
279. Chen, J. L.; Chu, B.; Hsiao, B. S., Mineralization of hydroxyapatite in electrospun nanofibrous poly(L-lactic acid) scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2006,** 79A, 307-317.
280. Kou, R. Q.; Xu, Z. K.; Deng, H. T.; Liu, Z. M.; Seta, P.; Xu, Y. Y., Surface modification of microporous polypropylene membranes by plasma-induced graft polymerization of alpha-allyl glucoside. *Langmuir* **2003,** 19, 6869-6875.
281. Park, K.; Ju, Y. M.; Son, J. S.; Ahn, K. D.; Han, D. K., Surface modification of biodegradable electrospun nanofiber scaffolds and their interaction with fibroblasts. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **2007,** 18, 369-382.
282. Ma, Z. W.; Kotaki, M.; Yong, T.; He, W.; Ramakrishna, S., Surface engineering of electrospun polyethylene terephthalate (PET) nanofibers towards development of a new material for blood vessel engineering. *Biomaterials* **2005,** 26, 2527-2536.
283. Yoshimoto, H.; Shin, Y. M.; Terai, H.; Vacanti, J. P., A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2003,** 24, 2077-2082.
284. Bashur, C. A.; Dahlgren, L. A.; Goldstein, A. S., Effect of fiber diameter and orientation on fibroblast morphology and proliferation on electrospun poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) meshes. *Biomaterials* **2006,** 27, 5681-5688.
285. Ito, Y.; Hasuda, H.; Kamitakahara, M.; Ohtsuki, C.; Tanihara, M.; Kang, I. K.; Kwon, O. H., A composite of hydroxyapatite with electrospun biodegradable nanofibers as a tissue engineering material. *J. Biosci. Bioeng.* **2005,** 100, 43-49.
286. Whited, B. M.; Whitney, J. R.; Hofmann, M. C.; Xu, Y.; Rylander, M. N., Pre-osteoblast infiltration and differentiation in highly porous apatite-coated PLLA electrospun scaffolds. *Biomaterials* **2011,** 32, 2294-2304.
287. Ma, Z. W.; He, W.; Yong, T.; Ramakrishna, S., Grafting of gelatin on electrospun poly(caprolactone) nanofibers to improve endothelial cell spreading and proliferation and to control cell orientation. *Tissue Eng.* **2005,** 11, 1149-1158.
288. Choi, J. S.; Leong, K. W.; Yoo, H. S., In vivo wound healing of diabetic ulcers using electrospun nanofibers immobilized with human epidermal growth factor (EGF). *Biomaterials* **2008,** 29, 587-596.
289. Kim, T. G.; Park, T. G., Surface functionalized electrospun biodegradable nanofibers for immobilization of bioactive molecules. *Biotechnol. Prog.* **2006,** 22, 1108-1113.
290. Kim, T. G.; Park, T. G., Biomimicking extracellular matrix: Cell adhesive RGD peptide modified electrospun poly(D,L-lactic-Co-glycolic acid) nanofiber mesh. *Tissue Eng.* **2006,** 12, 221-233.

291. Zander, N. E.; Orlicki, J. A.; Rawlett, A. M.; Beebe, T. P., Jr., Surface-modified nanofibrous biomaterial bridge for the enhancement and control of neurite outgrowth. *Biointerphases* **2010,** 5, 149-158.
292. Zhu, Y. B.; Gao, C. Y.; Liu, X. Y.; Shen, J. C., Surface modification of polycaprolactone membrane via aminolysis and biomacromolecule immobilization for promoting cytocompatibility of human endothelial cells. *Biomacromolecules* **2002,** 3, 1312-1319.
293. Kim, J.-E.; Noh, K.-T.; Yu, H.-S.; Lee, H.-Y.; Jang, J.-H.; Kim, H.-W., A Fibronectin Peptide-Coupled Biopolymer Nanofibrous Matrix to Speed Up Initial Cellular Events. *Advanced Engineering Materials* **2010,** 12, B94-B100.
294. Koh, H. S.; Yong, T.; Chan, C. K.; Ramakrishna, S., Enhancement of neurite outgrowth using nano-structured scaffolds coupled with laminin. *Biomaterials* **2008,** 29, 3574-3582.
295. Patel, S.; Kurpinski, K.; Quigley, R.; Gao, H.; Hsiao, B. S.; Poo, M.-M.; Li, S., Bioactive nanofibers: Synergistic effects of nanotopography and chemical signaling on cell guidance. *Nano Lett.* **2007,** 7, 2122-2128.
296. Kim, T. G.; Park, S.-H.; Chung, H. J.; Yang, D.-Y.; Park, T. G., Hierarchically Assembled Mesenchymal Stem Cell Spheroids Using Biomimicking Nanofilaments and Microstructured Scaffolds for Vascularized Adipose Tissue Engineering. *Adv. Funct. Mater.* **2010,** 20, 2303-2309.
297. Xie, J. W.; Wang, C. H., Electrospun micro- and nanofibers for sustained delivery of paclitaxel to treat C6 glioma in vitro. *Pharm. Res.* **2006,** 23, 1817-1826.
298. Xing, Z. C.; Chae, W. P.; Baek, J. Y.; Choi, M. J.; Jung, Y.; Kang, I. K., In Vitro Assessment of Antibacterial Activity and Cytocompatibility of Silver-Containing PHBV Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering. *Biomacromolecules* **2010,** 11, 1248-1253.
299. Jose, M. V.; Thomas, V.; Johnson, K. T.; Dean, D. R.; Nyairo, E., Aligned PLGA/HA nanofibrous nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* **2009,** 5, 305-315.
300. Wutticharoenmongkol, P.; Sanchavanakit, N.; Pavasant, P.; Supaphol, P., Preparation and characterization of novel bone scaffolds based on electrospun polycaprolactone fibers filled with nanoparticles. *Macromol. Biosci.* **2006,** 6, 70-77.
301. Meng, W.; Kim, S. Y.; Yuan, J.; Kim, J. C.; Kwon, O. H.; Kawazoe, N.; Chen, G. P.; Ito, Y.; Kang, I. K., Electrospun PHBV/collagen composite nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **2007,** 18, 81-94.
302. Meng, W.; Xing, Z. C.; Jung, K. H.; Kim, S. Y.; Yuan, J.; Kang, I. K.; Yoon, S. C.; Shin, H. I., Synthesis of gelatin-containing PHBV nanofiber mats for biomedical application. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **2008,** 19, 2799-2807.
303. Fu, Y.-C.; Nie, H.; Ho, M.-L.; Wang, C.-K.; Wang, C.-H., Optimized bone regeneration based on sustained release from three-dimensional fibrous PLGA/HAp composite scaffolds loaded with BMP-2. *Biotechnol. Bioeng.* **2008,** 99, 996-1006.
304. Nie, H.; Wang, C.-H., Fabrication and characterization of PLGA/HAp composite scaffolds for delivery of BMP-2 plasmid DNA. *J. Controlled Release* **2007,** 120, 111-121.
305. Reusch, R. N., LOW-MOLECULAR-WEIGHT COMPLEXED POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) - A DYNAMIC AND VERSATILE MOLECULE IN-VIVO. *Can. J. Microbiol.* **1995,** 41, 50-54.
306. Martin, D. P.; Peoples, O. P.; Williams, S. F.; Zhong, L. H. Nutritional and therapeutic uses of 3-hydroxyalkanoate oligomers. 1999.
307. Williams, S. F.; Martin, D. P.; Gerngross, T.; Horowitz, D. M. Medical device containing polyhydroxyalkanoate treated woth oxidizing agent to remove endotoxin. 2001.
308. Choi, J. S.; Lee, S. W.; Jeong, L.; Bae, S. H.; Min, B. C.; Youk, J. H.; Park, W. H., Fiect of organosoluble salts on the nanofibrous structure of electrospun poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Int. J. Biol. Macromol.* **2004,** 34, 249-256.
309. Sombatmankhong, K.; Suwantong, O.; Waleetorncheepsawat, S.; Supaphol, P., Electrospun fiber mats of poly(3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), and their blends. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics* **2006,** 44, 2923-2933.
310. Cheng, M. L.; Lin, C. C.; Su, H. L.; Chen, P. Y.; Sun, Y. M., Processing and characterization of electrospun poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) nanofibrous membranes. *Polymer* **2008,** 49, 546-553.
311. Kim, J.; Kwak, T.; Lim, J.; Noda, I.; Im, S.; Jeong, S., Fabrication of Biodegradable Nanofibers of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) via Electrospinning. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2009,** 9, 914-918.
312. Tong, H. W.; Wang, M., An Investigation into the Influence of Electrospinning Parameters on the Diameter and Alignment of Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) Fibers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2011,** 120, 1694-1706.

313. Tehrani, A. H.; Zadhoush, A.; Karbasi, S.; Khorasani, S. N., Experimental Investigation of the Governing Parameters in the Electrospinning of Poly(3-hydroxybutyrate) Scaffolds: Structural Characteristics of the Pores. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010,** 118, 2682-2689.
314. Del Gaudio, C.; Ercolani, E.; Nanni, F.; Bianco, A., Assessment of poly(epsilon-caprolactone)/poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) blends processed by solvent casting and electrospinning. *Materials Science and Engineering a-Structural Materials Properties Microstructure and Processing* **2011,** 528, 1764-1772.
315. Cheng, M. L.; Chen, P. Y.; Lan, C. H.; Sun, Y. M., Structure, mechanical properties and degradation behaviors of the electrospun fibrous blends of PHBHHx/PDLLA. *Polymer* **2011,** 52, 1391-1401.
316. Lee, I. S.; Kwon, O. H.; Meng, W.; Kang, I. K., Nanofabrication of microbial polyester by electrospinning promotes cell attachment. *Macromol. Res.* **2004,** 12, 374-378.
317. Yun, S. H.; Kim, Y. J.; Kwon, O. K.; Choi, M. S.; Kwon, O. H., Fabrication and Characterization of Biodegradable Nanofiber Containing Gelatin. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **2008,** 5, 835-841.
318. Bretcanu, O.; Misra, S. K.; Yunos, D. M.; Boccaccini, A. R.; Roy, I.; Kowalczyk, T.; Blonski, S.; Kowalewski, T. A., Electrospun nanofibrous biodegradable polyester coatings on Bioglass (R)-based glass-ceramics for tissue engineering. *Mater. Chem. Phys.* **2009,** 118, 420-426.
319. Tong, H. W.; Wang, M., Electrospinning of aligned biodegradable polymer fibers and composite fibers for tissue engineering applications. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2007,** 7, 3834-3840.
320. Suwantong, O.; Waleetorncheepsawat, S.; Sanchavanakit, N.; Pavasant, P.; Cheepsunthorn, P.; Bunaprasert, T.; Supaphol, P., In vitro biocompatibility of electrospun poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) fiber mats. *Int. J. Biol. Macromol.* **2007,** 40, 217-223.
321. Sombatmankhong, K.; Sanchavanakit, N.; Pavasant, P.; Supaphol, P., Bone scaffolds from electrospun fiber mats of poly (3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and their blend. *Polymer* **2007,** 48, 1419-1427.
322. Yu, B. Y.; Chen, P. Y.; Sun, Y. M.; Lee, Y. T.; Young, T. H., The behaviors of human mesenchymal stem cells on the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx) membranes. *Desalination* **2008,** 234, 204-211.
323. Yu, B.-Y.; Chen, C.-R.; Sun, Y.-M.; Young, T.-H., The response of rat cerebellar granule neurons (rCGNs) to various polyhydroxyalkanoate (PHA) films. *Desalination* **2009,** 245, 639-646.
324. Ma, G. P.; Yang, D. Z.; Wang, K. M.; Han, J.; Ding, S. M.; Song, G. Q.; Nie, J., Organic-Soluble Chitosan/Polyhydroxybutyrate Ultrafine Fibers as Skin Regeneration Prepared by Electrospinning. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010,** 118, 3619-3624.
325. Veleirinho, B.; Ribeiro-do-Valle, R. M.; Lopes-da-Silva, J. A., Processing conditions and characterization of novel electrospun poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)/chitosan blend fibers. *Mater. Lett.* **2011,** 65, 2216-2219.
326. Ndreu, A.; Nikkola, L.; Ylikauppila, H.; Ashammakhi, N.; Hasirci, V., Electrospun biodegradable nanofibrous mats for tissue engineering. *Nanomed.* **2008,** 3, 45-60.
327. Chan, K. H. K.; Wong, S. Y.; Tiju, W. C.; Li, X.; Kotaki, M.; Bin He, C., Morphologies and Electrical Properties of Electrospun Poly (R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyvalerate /Multiwalled Carbon Nanotubes Fibers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010,** 116, 1030-1035.
328. Kuppan, P.; Vasanthan, K. S.; Sundaramurthi, D.; Krishnan, U. M.; Sethuraman, S., Development of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Fibers for Skin Tissue Engineering: Effects of Topography, Mechanical, and Chemical Stimuli. *Biomacromolecules* **2011,** 12, 3156-3165.
329. Wang, Y.; Gao, R.; Wang, P.-P.; Jian, J.; Jiang, X.-L.; Yan, C.; Lin, X.; Wu, L.; Chen, G.-Q.; Wu, Q., The differential effects of aligned electrospun PHBHHx fibers on adipogenic and osteogenic potential of MSCs through the regulation of PPARγ signaling. *Biomaterials* **2012,** 33, 485-493.
330. Lu, L. X.; Wang, Y. Y.; Mao, X.; Xiao, Z. D.; Huang, N. P., The effects of PHBV electrospun fibers with different diameters and orientations on growth behavior of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biomedical Materials* **2012,** 7.
331. Masaeli, E.; Morshed, M.; Rasekhian, P.; Karbasi, S.; Karbalaie, K.; Karamali, F.; Abedi, D.; Razavi, S.; Jafarian-Dehkordi, A.; Nasr-Esfahani, M. H.; Baharvand, H., Does the tissue engineering architecture of poly(3-hydroxybutyrate) scaffold affects cell-material interactions? *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2012,** 100A, 1907-1918.
332. Xing, Z.-C.; Chae, W.-P.; Baek, J.-Y.; Choi, M.-J.; Jung, Y.; Kang, I.-K., In Vitro Assessment of Antibacterial Activity and Cytocompatibility of Silver-Containing PHBV Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering. *Biomacromolecules* **2010,** 11, 1248-1253.

333. Yu, W.; Lan, C. H.; Wang, S. J.; Fang, P. F.; Sun, Y. M., Influence of zinc oxide nanoparticles on the crystallization behavior of electrospun poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nanofibers. *Polymer* **2010,** 51, 2403-2409.
334. Kim, Y. J.; Kim, S. N.; Kwon, O. K.; Park, M. R.; Kang, I. K.; Lee, S. G., Preparation and Characterization of Electrospun Nanofibers Containing Natural Antimicrobials. *Polymer-Korea* **2009,** 33, 307-312.
335. Naveen, N.; Kumar, R.; Balaji, S.; Uma, T. S.; Natrajan, T. S.; Sehgal, P. K., Synthesis of Nonwoven Nanofibers by Electrospinning - A Promising Biomaterial for Tissue Engineering and Drug Delivery. *Advanced Engineering Materials* **2010,** 12, B380-B387.
336. Tong, H. W.; Zhang, X.; Wang, M., A new nanofiber fabrication technique based on coaxial electrospinning. *Mater. Lett.* **2012,** 66, 257-260.
337. Wang, C.; Yan, K. W.; Lin, Y. D.; Hsieh, P. C. H., Biodegradable Core/Shell Fibers by Coaxial Electrospinning: Processing, Fiber Characterization, and Its Application in Sustained Drug Release. *Macromolecules* **2010,** 43, 6389-6397.
338. Wang, W.; Cao, J.; Lan, P.; Wu, W., Drug release from electrospun fibers of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) grafted with poly(N-vinylpyrrolidone). *J. Appl. Polym. Sci.* **2012,** 124, 1919-1928.
339. Kim, Y. J.; Bae, H. I.; Kwon, O. K.; Choi, M. S., Three-dimensional gastric cancer cell culture using nanofiber scaffold for chemosensitivity test. *Int. J. Biol. Macromol.* **2009,** 45, 65-71.

Chapitre 2

Synthèse de (co)polyesters sous micro-ondes

2.1. Introduction et contexte

La nécessité d'élaborer de nouvelles matrices répondant au cahier des charges propre aux applications en ingénierie tissulaire s'impose fortement. Dans ce cadre, l'utilisation des PHAs s'avère être très intéressante. Néanmoins, comme tous les polymères aliphatiques, ils ne présentent pas intrinsèquement les propriétés idéales requises pour cette application puisqu'ils ne sont pas ostéconductifs et permettent une adhésion cellulaire faible qui est en fait liée aux capacités des matériaux à lier les protéines circulantes.

En revanche, la maîtrise de leur bioconversion offre la possibilité de contrôler leur composition mais l'éventail de modifications disponibles et le rendement s'avèrent souvent insuffisants. De manière plus intéressante et plus polyvalente, l'ingénierie macromoléculaire comme la copolymérisation et/ou la modification chimique, à partir de PHAs disponibles en plus grande quantité, permet d'accroître la gamme de leurs propriétés et surtout d'accéder à des architectures fonctionnalisées dont la synthèse par bioconversion demeure difficile, voire impossible. Dans cette optique, des matériaux sur mesure, correspondant au cahier des charges d'une application définie, sont alors envisageables. A titre d'exemple, l'introduction de groupements réactifs spécifiques modifie la nature hydrophobe des PHAs et grâce à certaines fonctions comme les acides carboxyliques, il devient possible de coupler de manière covalente des molécules bioactives. Deux démarches sont envisageables pour introduire des fonctions chimiques réactives sur les chaînes latérales des PHAs :

- soit par la microbiologie, en faisant directement produire les polyesters fonctionnalisés par les bactéries. Cet aspect ne sera pas développé au cours de la thèse.[1]
- soit par la modification chimique post-polymérisation de polymères natifs porteurs de fonctions réactives sur leurs chaînes latérales. (cf. **Figure 2.1**).

Les polymères les plus étudiés pour la modification chimique possèdent des motifs de répétition dont la chaîne latérale est terminée par une double liaison. Ces polymères insaturés, usuellement nommés poly(3-HO-*co*-3-HU) (PHOU) sont des polymères originaux et potentiellement importants en raison de la possibilité d'introduire de nouvelles fonctionnalités comme des groupements acide carboxylique, époxyde ou encore alcool (**Figure 2-1**). Lee *et al.*[2] ont décrit la préparation de PHAs porteurs de groupements diol en présence de permanganate de potassium dans des conditions douces. L'hydroboration des fonctions alcène du PHOU permet d'introduire des fonctions alcool en chaîne latérale.[3] Des fonctions époxyde peuvent également être introduites par des réactions d'époxydation en utilisant l'acide *m*-chloroperbenzoïque (*m*-CPBA).[4] Par réaction avec une diamine, les fonctions époxyde peuvent

conduire à des fonctions amine dont le pKa estimé entre 8 et 8,5 permet de préparer des polycations hydrosolubles à pH physiologique, ce qui s'avère être particulièrement intéressant pour des applications de complexation d'ADN plasmidique.[5] Différents auteurs ont décrit la préparation de PHAs possédant en position latérale des fonctions acide carboxylique. Cette réaction peut être réalisée en présence d'une solution basique (bicarbonate de potassium)[6] ou de permanganate de potassium[7] ou encore en présence de tétroxyde d'osmium.[8]

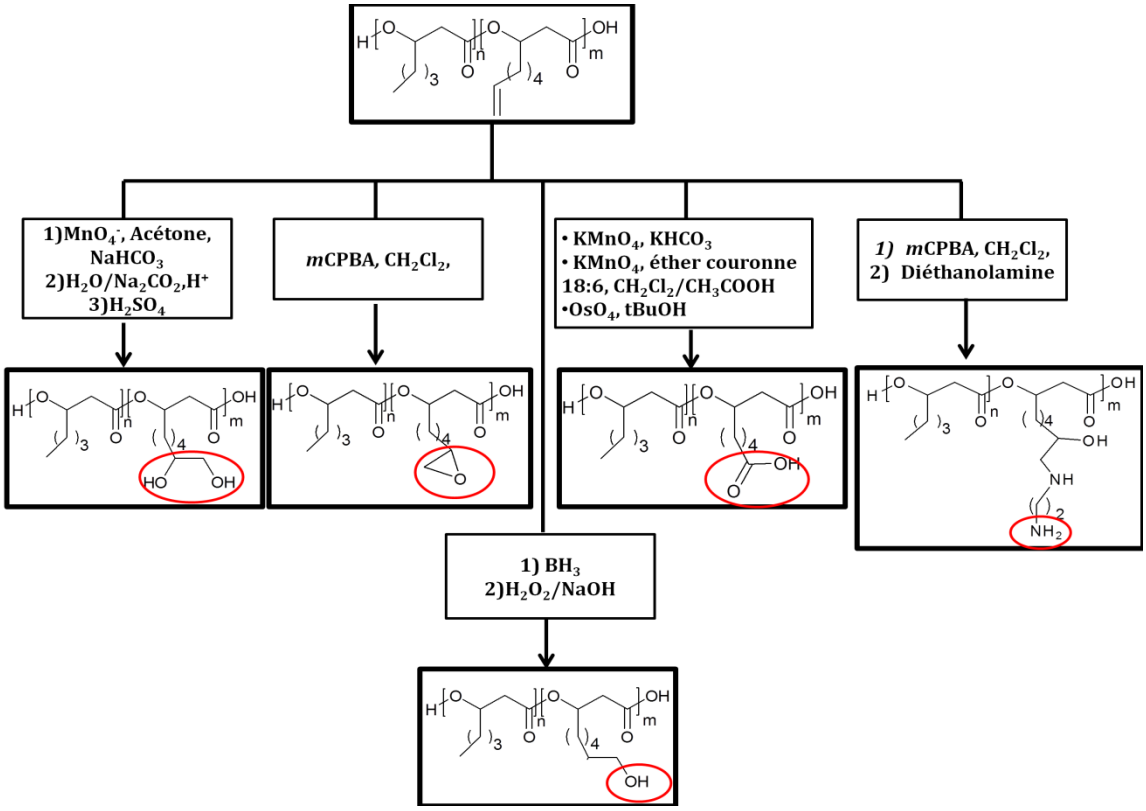


Figure 2-1 : Modifications chimiques du PHOU par diverses réactions d'oxydation.

D'autre part, les propriétés des PHAs peuvent également être modulées grâce à des réactions de couplage avec d'autres polymères. Cette approche repose sur la préparation d'oligoesters fonctionnalisés aux extrémités. Selon la méthode chimique employée, la nature des extrémités diffère. Quatre procédés peuvent être distingués : la dégradation thermique[9], les réactions de transestérification[10, 11], l'hydrolyse[12] et la méthanolyse (**Figure 2-2**).[3, 13] Il est important de noter que le procédé d'hydrolyse génère deux types de structure à savoir des oligomères terminés par une fonction alcool et une fonction acide carboxylique mais également des oligomères terminés par une fonction acide et une fonction de type acide crotonique. La méthanolyse génère des oligomères hydroxytéléchéliques parfaitement définis qui peuvent être utilisés comme macroamorceurs pour la polymérisation par ouverture de cycle de l'ε-caprolactone. Timbart *et al.* ont étudié les variations des propriétés physiques des copolymères à bloc PHOU-*b*-PCL et PHO-*b*-PCL synthétisés de cette manière.[3, 13] Récemment, Lemechko *et al.*

ont préparé des oligomères portant une fonction alcyne terminale par transestérification afin de réaliser divers couplages par chimie « click » avec des macromolécules hydrophiles comme le dextrane[14] ou la poly(oxazoline).[10] La préparation d'oligomères dégradés thermiquement permet de générer une fonction acide carboxylique mobilisable notamment pour des réactions d'estérification avec les groupements hydroxyle de différentes molécules.[15] En utilisant cette approche, Babinot *et al.* ont synthétisé des copolymères diblocs amphiphiles par chimie « click » et mis en évidence la formation de micelles en milieu aqueux.[16] D'autre part, des copolymères PHOU-*g*-PEG amphiphiles ont également été élaborés par addition thiol-ène dans le but de former des polymersomes pour la libération de principes actifs.[17]

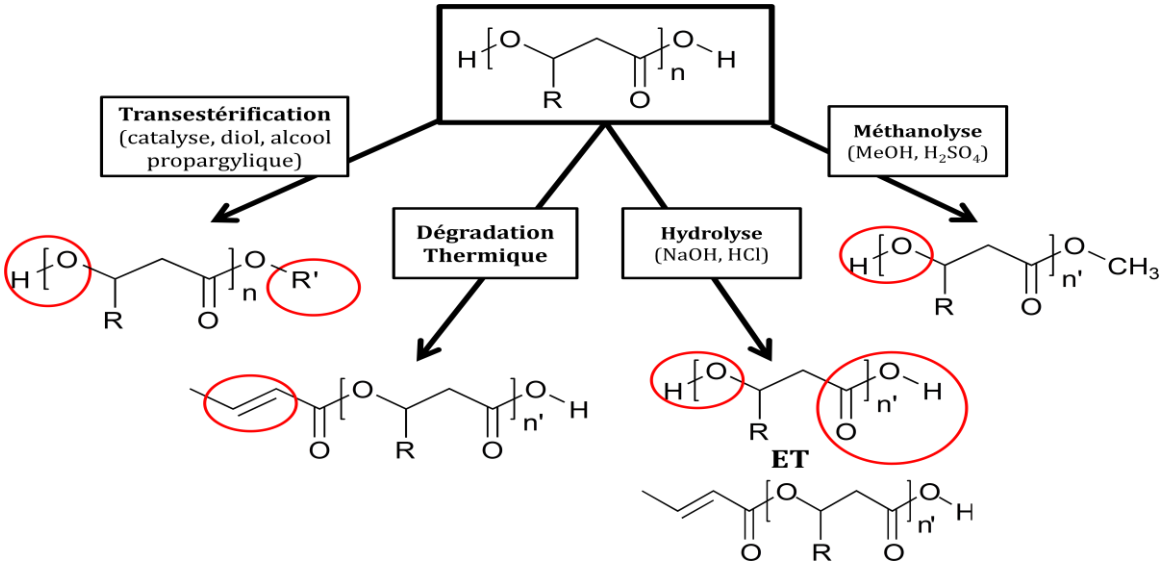


Figure 2-2 : Structures chimiques des oligomères générés par différentes réactions dégradatives.

Les propriétés de surface de supports à base de PHAs telles que la balance hydrophile/hydrophobe peuvent aussi être modulées par chimie radicalaire dans différentes conditions. La modification de surface de films de PHBHV, conduisant à la formation de copolymères greffés sur l'extrême surface du film, a été effectuée par la technique du « grafting from » de poly(méthacrylate d'hydroxyéthyle) (PHEMA) soit par polymérisation radicalaire classique,[18] soit par polymérisation radicalaire par transfert d'atomes, amorcées à partir de la surface.[19] Cette copolymérisation peut également être envisagée grâce à une irradiation UV en deux étapes avec une fonctionnalisation au préalable avec du peroxyde d'hydrogène.[20] Récemment, Versace *et al.* ont développé une méthode en une étape impliquant des sels de triarylsulfonium permettant de copolymériser le HEMA et l'acide méthacrylique en absence de réaction parasite sous irradiation UV.[21]

C'est dans le cadre de l'élaboration de copolymères fonctionnalisés et/ou fonctionnalisables que s'inscrit la présente étude. L'objectif est de mettre au point des copolymères à base de PHAs susceptibles de répondre aux exigences structurales et fonctionnelles d'une application en ingénierie tissulaire de l'os. Pour pouvoir répondre à ce cahier des charges, la chimie de surface, l'architecture tridimensionnelle et la porosité du matériau sont des paramètres cruciaux qu'il est nécessaire de combiner au mieux à partir des polymères constituant ces matrices.

Au cours de notre étude, l'élaboration de copolymères composés de deux partenaires aux propriétés de dégradation différentes (le PHA et le PLA) a été développée dans le but de générer par la suite des fibres de polyesters caractérisées par une double porosité. Une autre approche repose sur l'élaboration de copolymère PLA-*b*-PHOU, dont le partenaire PHOU offre l'intérêt d'introduire des groupements réactifs indispensables à la fonctionnalisation du matériau par couplage de molécules bioactives responsables de la réponse biologique recherchée.

Au-delà de la structure des copolymères élaborés, l'originalité de cette étude réside dans la source d'énergie utilisée. Afin de coller avec le désir d'une voie de synthèse propre et transposable dans l'industrie des polymères, nous avons choisi de procéder à l'aide des micro-ondes. Pour ce faire, nous avons utilisé la polymérisation du lactide amorcée par des oligomères ω-hydroxyle de PHAs.

2.2. Synthèse de copolymères à blocs à base de PHAs

De nos jours, le développement de nouveaux matériaux ayant un faible impact sur l'environnement, notamment à base de produits biosourcés, représente un axe de recherche majeur. Néanmoins, la polymérisation de ces monomères ou la modification des polymères générés dans le but d'améliorer leurs propriétés pour des applications données entraînent la mise en place de procédures parfois nocives pour l'environnement et possédant un coût énergétique élevé.

Durant ces dernières années, le chauffage par micro-ondes a prouvé son efficacité ainsi que sa polyvalence afin de réaliser diverses réactions chimiques.[21, 22] L'activation sous micro-ondes a été utilisée pour plusieurs types de polymérisations telles que la polycondensation, les polymérisations radicalaires classiques[23] et contrôlées[24] ou encore la polymérisation par

ouverture de cycle (ROP).[25] Des homopolymères et des copolymères de 2-oxazoline [26], lactone[27], lactide[28] ou encore de lactame[29] ont ainsi pu être synthétisés efficacement et de manière plus rapide qu'en ayant recours à un chauffage conventionnel.

L'utilisation du chauffage diélectrique par micro-ondes pour la synthèse de (co)polymères présente plusieurs avantages tels que de meilleurs taux de conversion, des temps de réaction plus courts ou encore la facilité de réalisation de synthèses sans l'utilisation de solvant. Par cette technologie, plusieurs copolymères ont été élaborés, notamment à partir de différents polyesters, afin d'apporter les propriétés propres de chaque partenaire. Les PHAs peuvent être couplés à d'autres polymères afin d'améliorer leurs propriétés thermiques, mécaniques ou encore l'hydrophilie ; cependant, aucun travail n'a été rapporté sur la synthèse de copolymères à base de ces polyesters biosourcés sous micro-ondes. Dans ce contexte, nous avons entrepris la synthèse de divers copolymères à blocs à base de PHAs et de PLA grâce à l'énergie fournie par les micro-ondes.

Dans la perspective de réaliser la synthèse contrôlée de copolymères à blocs PHA-*b*-PLA, les conditions optimales de copolymérisation du D,L-Lactide ont été déterminées par l'utilisation d'un macroamorceur modèle tel que le PEG de masse molaire de 5 000 $g.mol^{-1}$.

2.2.1. Etude préliminaire : synthèse sous micro-ondes de copolymères PEG-*b*-PLA

La synthèse de copolymères PEG_{5000}-*b*-PLA s'effectue sous irradiation par chauffage micro-onde à la température de 135 °C après une distillation azéotropique d'une nuit du mélange de lactide et de PEG_{5000} dans des proportions $[LA]_0/[PEG_{5000}]_0 = 200$ et avec l'octanoate d'étain comme catalyseur. Le **Tableau 2-1** résume les caractéristiques des copolymères synthétisés pour différentes durées d'irradiation. Tout d'abord, il est possible d'observer les taux de conversion du lactide élevés de l'ordre de 77 % dès la première minute de polymérisation, démontrant l'efficacité du chauffage par micro-ondes. De plus, les excellents rapports entre les masses molaires théoriques et les masses molaires calculées par RMN ^1H révèlent des efficacités d'amorçage comprises entre 0,88 et 0,97. Les indices de polymolécularité déterminés par SEC augmentent avec la durée d'irradiation, ce qui peut être attribué à des réactions de transestérification des chaînes de PLA. La durée maximale de 5 minutes d'irradiation permet d'obtenir une efficacité d'amorçage élevée tout en conservant des I_p faibles.

Tableau 2-1 : Synthèse de copolymères PEG_{5000}-*b*-PLA pour différentes durées d'irradiation par micro-ondes. Rapport $[LA]_0/[PEG_{5000}]_0$ = 200, T = 135 °C.

Durée (min)	p [a] (%)	$M_{n,théo.}$ [b] (g.mol^{-1})	$M_{n,RMN}$ [c] (g.mol^{-1})	$M_{n,SEC}$ [d] (g.mol^{-1})	f [e]	I_p [d]
1	77	27 200	32 200	24 000	0,89	1,3
5	80	28 000	28 900	17 300	0,97	1,3
10	77	27 200	32 300	29 300	0,93	1,5
20	68	24 500	27 800	15 100	0,88	1,7
30	75	26 600	29 800	16 100	0,89	1,7

[a] Conversion du LA déterminée par gravimétrie
[b] $M_n = M_{n,macroamorceur} + [LA]_0/[PEG_{5000}]_0 \times M_{LA} \times p$
[c] déterminée par RMN ^{1}H
[d] déterminé par SEC-RI (THF, étalons de polystyrène)
[e] $f = M_{n,théo.} / M_{n,RMN}$

Afin d'approfondir cette étude, plusieurs copolymères de différentes compositions ont été synthétisés utilisant la ROP du lactide amorcée par le PEG_{5000}. Trois rapports molaires $[LA]_0/[PEG_{5000}]_0$ (50, 100 et 200) ont été utilisés pour générer différentes longueurs du bloc de PLA. Le **Tableau 2-2** regroupe les caractéristiques principales associées aux diblocs synthétisés. Les masses molaires calculées par RMN ^{1}H ainsi que les I_p varient de 10 500 g.mol^{-1} à 28 900 g.mol^{-1} et de 1,1 à 1,3, respectivement. Ces indices de polymolécularité faibles couplés avec des efficacités d'amorçage proches de 1 (entre 0,84 et 0,99) démontrent le caractère contrôlé de la copolymérisation et la formation efficace de structures diblocs bien définies.

Tableau 2-2 : Synthèse de copolymères PEG_{5000}-*b*-PLA pour différents rapports $[LA]_0/[PEG_{5000}]_0$. T = 135 °C, t = 5 minutes.

Rapport $[LA]_0/[PEG_{5000}]_0$	p [a] (%)	$M_{n,théo.}$ [b] (g.mol^{-1})	$M_{n,RMN}$ [c] (g.mol^{-1})	$M_{n,SEC}$ [d] (g.mol^{-1})	f [e]	I_p [d]
50	75	10 400	10 500	11 100	0,99	1,1
100	72	14 500	17 400	13 200	0,84	1,2
200	80	28 000	28 900	17 300	0,97	1,3

[a] Conversion du LA déterminée par gravimétrie
[b] $M_n = M_{n,macroamorceur} + [LA]_0/[PEG_{5000}]_0 \times M_{LA} \times p$
[c] déterminée par RMN ^{1}H
[d] déterminé par SEC-RI (THF, étalons de polystyrène)
[e] $f = M_{n,théo.} / M_{n,RMN}$

La structure chimique des copolymères obtenus a été caractérisée par RMN ^{1}H. La **Figure 2-3a** présente le spectre d'un copolymère dibloc PEG$_{5000}$-*b*-PLA comprenant les bandes caractéristiques du PLA à 1,55 ppm (2, C*H*$_3$-CHO-) et à 5,18 ppm (1, -O-C*H*-CH$_3$) mais aussi du PEG à 3,64 ppm (b, c, -C*H*$_2$-C*H*$_2$-O-) et à 3,38 ppm (a, C*H*$_3$-O-) correspondant à l'extrémité méthyle éther. D'autre part, les chromatogrammes du macroamorceur et d'un copolymère synthétisé sont présentés sur la **Figure 2-3b**. Tous les chromatogrammes des copolymères présentent une distribution monomodale des masses molaires. En outre, il est possible d'observer un déplacement du pic correspondant au copolymère vers les masses molaires plus élevées, confirmant la formation du copolymère dibloc PEG$_{5000}$-*b*-PLA.

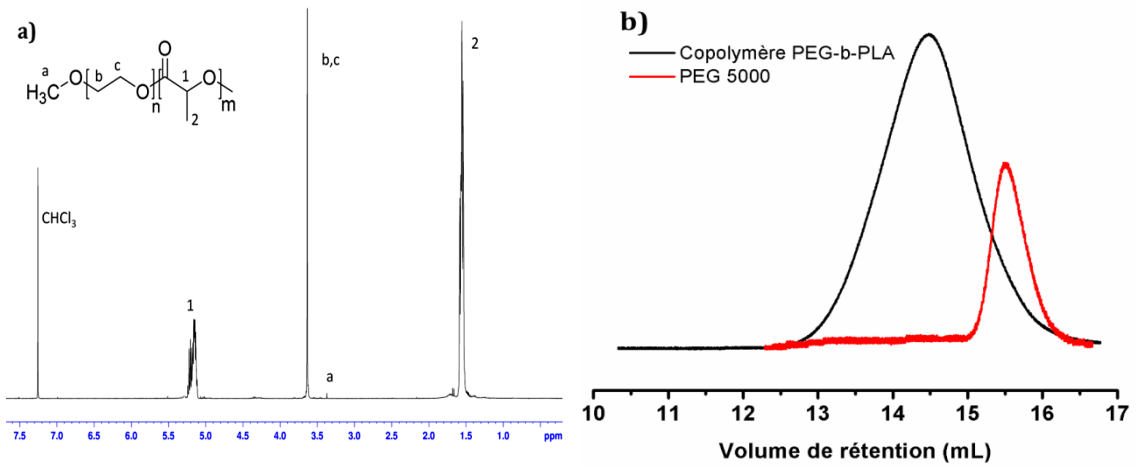


Figure 2-3 : a)Spectre ^{1}H RMN caractéristique d'un copolymère PEG$_{5000}$-*b*-PLA, b) Chromatogrammes d'un macroamorceur et d'un copolymère PEG$_{5000}$-*b*-PLA.

Les études préliminaires de synthèse de copolymères PEG$_{5000}$-*b*-PLA ont montré qu'une durée de polymérisation de 5 minutes était suffisante pour obtenir des taux de conversion élevés et des I_p relativement faibles. Dans les parties suivantes, articulées autour de trois articles publiés, la synthèse de copolymères PHA-*b*-PLA sera précisément décrite et les effets d'un chauffage diélectrique par micro-ondes sur la dégradation des PHAs ou la ROP du lactide seront discutés.

2.2.2. Synthèse de copolymères PHAs-*b*-PLA

Sous irradiation micro-ondes, la polymérisation en masse par ouverture de cycle du D,L-lactide peut être efficacement amorcée par des macro-amorceurs monohydroxylés à base de PHBHV et de PHBHHx de différentes masses molaires (7 000 et 12 000 g.mol^{-1}) préalablement préparés par méthanolyse sous catalyse acide des PHAs natifs. Par conséquent, différents copolyesters diblocs ont été élaborés et caractérisés structuralement et thermiquement avec une composition en PLA, déterminée par RMN ^{1}H et ATG, variant de 49 à 81 % (m/m). Des copolymères de masses molaires comprises entre 14 000 et 45 000 g.mol^{-1} ont été synthétisés. D'autre part, les paramètres de copolymérisation ont également été optimisés à 5 minutes d'irradiation pour une température de 115 °C afin d'obtenir une efficacité d'amorçage proche de 1 avec des conversions comprises entre 50 et 85 %. Les taux de conversion les plus faibles sont obtenus pour les rapports molaires $[LA]_0/[PHA]_0$ les plus faibles (< 100), ce qui peut être expliqué par la forte viscosité du milieu imputable à la concentration élevée en macroamorceurs de PHAs.

Par ailleurs, l'étude cinétique de la polymérisation du lactide par ouverture de cycle sous micro-ondes a montré son caractère vivant et contrôlé avec une augmentation linéaire de la masse molaire et la baisse de l'I_p en fonction de la conversion dans les conditions sélectionnées. En outre, les caractérisations par DSC montrent un déplacement de la T_g des copolymères analysés, en fonction de leur composition, vers celle des homopolymères de PHAs et de PLA natifs. Enfin, la synthèse de copolymères à partir d'un macro-amorceur de PHO a également été étudiée menant à une polymérisation avec un taux de conversion faible (30 %). Ce résultat peut être interprété comme la conséquence de l'accessibilité limitée de la fonction alcool terminale mais aussi par une viscosité supérieure des PHAs à longues chaînes latérales, inhérente à leur caractère caoutchouteux susceptible de constituer une entrave à la diffusion du lactide au sein du mélange. En effet, il est important de noter que des copolymères PHO-*b*-PCL ont été synthétisés au laboratoire mais en solution et non en masse.[31]

ARTICLE n°1

JOURNAL OF POLYMER SCIENCE Polymer Chemistry WWW.POLYMERCHEMISTRY.ORG ARTICLE

Microwave-Assisted Synthesis and Characterization of Biodegradable Block Copolyesters Based on Poly(3-hydroxyalkanoate)s and Poly(D,L-lactide)

Julien Ramier, Estelle Renard, Daniel Grande

Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est, Equipe "Systèmes Polymères Complexes," UMR 7182 CNRS – Université Paris-Est Créteil, 2, rue Henri Dunant, Thiais 94320, France
Correspondence to: D. Grande (E-mail: grande@icmpe.cnrs.fr)

Received 26 September 2011; accepted 24 December 2011; published online 28 January 2012
DOI: 10.1002/pola.25916

ABSTRACT: Microwave (MW)-assisted ring-opening polymerization (ROP) provides a rapid and straightforward method for engineering a wide array of well-defined poly(3-hydroxyalkanoate)-*b*-poly(D,L-lactide) (PHA-*b*-PLA) diblock copolymers. On MW irradiation, the bulk ROP of D,L-lactide (LA) could be efficiently triggered by a series of monohydroxylated PHA-based macroinitiators previously produced via acid-catalyzed methanolysis of corresponding native PHAs, thus affording diblock copolyesters with tunable compositions. The dependence of LA polymerization on temperature, macroinitiator structure, irradiation time, and $[LA]_0/[PHA]_0$ molar ratio was carefully investigated. It turned out that initiator efficiency values close to 1 associated with conversions ranging from 50 to 85% were obtained only after 5 min at 115 °C. A kinetic investigation of the MW-assisted ROP of LA gave evidence of its "living"/controlled character under the experimental conditions selected. Structural analyses and thermal properties of biodegradable diblock copolyesters were also performed. © 2012 Wiley Periodicals, Inc. J Polym Sci Part A: Polym Chem 50: 1445–1455, 2012

KEYWORDS: biodegradable copolyesters; diblock copolymers; microwave-assisted ring-opening polymerization; poly(3-hydroxyalkanoate)s; poly(D,L-lactide)

INTRODUCTION Polyhydroxyalkanoates (PHAs) represent a class of thermoplastic biopolyesters produced by different bacterial microorganisms as intracellular energy and carbon supply materials when they are subjected to stress conditions (limiting oxygen, nitrogen, or essential nutrients).[1,2] These bacterial polyesters possess interesting properties for various applications in the biomedical field, such as sutures, delivery systems, and scaffolds for tissue engineering,[3] thanks to their tunable mechanical properties and mainly due to their biocompatibility and biodegradability.[4,5] Among the family of PHAs, poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) (PHBHV), and poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx) are increasingly used as bio-based systems involving *in vitro* and *in vivo* studies.[6,7] Several PHA-based copolymers have recently been elaborated to produce more effective materials for desired applications by introducing a poly(ethylene glycol) (PEG) block to enhance the hydrophilicity[8] or a poly(ε-caprolactone) (PCL) segment to improve the thermomechanical properties.[9] In addition to its well-known hydrolytic degradability,[10] poly(lactide) (PLA) possesses the ability to be easily incorporated to another polyester by copolymerization[11,12] or blending[13] to enhance the performance of both polymers. As the matter of fact, coupling PHAs and PLA within a block copolymer structure permits to tune the polymer degradation properties, as well as the thermomechanical ones with a soft PHA block (T_g below 0 °C) and a harder PLA segment (T_g around 50 °C).[14–17] Reducing the drawbacks of each biodegradable polyester while preserving their advantages will lead to the elaboration of promising materials for uses in various applications in the biomedical arena.

As a process with a weak environmental impact and many advantages, including higher yields, shorter reaction times, and ease of conducting solvent-free reactions, microwave (MW) irradiation is a highly efficient and versatile technique. The MW heating process comprises an electromagnetic radiation which leads to a dielectric heating mechanism, thus resulting in the elimination of the wall effects. Therefore, the heating homogeneity is higher than that encountered in a conventional heating.[18] The first MW-assisted synthesis has been reported in the 1980s in the field of organic chemistry,[19,20] but over the last decade, MW irradiation has largely been extended to polymer synthesis[21–23] involving a wide array of mechanisms, including polycondensation,[24,25] "click" polymerization,[26] controlled radical polymerization,[27,28] as well as ring-opening polymerization (ROP).[29] Among the

© 2012 Wiley Periodicals, Inc.

homopolymers synthesized by MW-assisted ROP, PCL,[30] poly(ε-caprolactam),[31] PLA,[32] and poly(2-oxazoline)[33,34] have been obtained in significantly shorter times than those needed in conventional conduction/convection thermal processes. Besides, graft copolymers[35] and several random, statistical[36] or block copolymers can be prepared by MW-assisted ROP. Zhang et al. have synthesized diblock[37] and triblock[38] copolymers of PLA though the use of various short PEG macroinitiators with tin (II) 2-ethylhexanoate as a catalyst to produce amphiphilic architectures. Such a ROP process has also been performed with a PEG/PCL[39] system and small peptide sequences with PEG.[40] However, to the best of our knowledge, no investigation has hitherto been reported on the formation of copolymers based on PHAs under MW irradiation.

In this article, we report on the novel MW-assisted synthesis of miscellaneous poly(3-hydroxyalkanoate)-*block*-poly(D,L-lactide) (PHA-*b*-PLA) diblock copolymers via ROP of D,L-lactide (LA) using PHA macroinitiators with varying molar masses. The dependence of the LA polymerization on temperature, macroinitiator structure, irradiation time, and $[LA]_0/[PHA]_0$ molar ratio was carefully investigated. Structural analyses and thermal properties of these biodegradable copolyesters were also explored.

EXPERIMENTAL

Materials

PHBHV [12 mol % HV units, M_n = 84,000 g mol^{-1}, polydispersity index (PDI) = 2.4] was purchased from Goodfellow and purified from his plasticizer by precipitation in ethanol. PHBHHx (9 mol % HHx units, M_n = 206,000 g mol^{-1}, PDI = 1.6) was generously supplied by Procter and Gamble, under the trade name NODAX. PHOHHx (15 mol % HHx units, M_n = 130,000 g mol^{-1}, PDI = 1.5) was obtained from EMPA (Swiss Fed Labs Mat Testing & Res, Lab Biomat, St Gallen, Switzerland) and was biosynthesized following a procedure previously reported.[41] Anhydrous toluene (99.8%), anhydrous methanol (99.8%), sulfuric acid (98%, H_2SO_4) 3,6-dimethyl-1,4-dioxane-2,5-dione (LA), PEG monomethyl ether (PEG, M_n = 5000 g mol^{-1}, PDI = 1.1), and tin (II) 2-ethylhexanoate (95%, $SnOct_2$) were purchased from Sigma-Aldrich. Dichloromethane and methanol used for dissolution and precipitation respectively were purchased from Carlo-Erba.

PHA Methanolysis

PHA degradation by methanolysis was performed following the procedure established by Timbart et al.[42] for PHOHHx. Typically, a PHA sample (1.5 g) was dissolved in 60 mL of CH_2Cl_2, then 60 mL of anhydrous methanol and 4.5 mL of H_2SO_4 were added. The solution was stirred with a magnetic stirrer and heated to 100 °C in an oil bath under pressure. The reaction time depended on the molar mass desired for the resulting polymer. After cooling in ice, the solution was washed with 15 mL of distilled water twice, dried under $MgSO_4$ and filtered. Finally, the solvent was evaporated and the product was dried overnight under vacuum at 40 °C.

MW-Assisted Synthesis of PHA-*b*-PLA Diblock Copolymers

LA polymerization was carried out in an Anton-Paar monomode 300 MW reactor. The MW source was a magnetron with a 2.5 GHz frequency powered by a 900 W power generator. Several $[LA]_0/[PHA]_0$ molar ratios were employed to generate diblock copolymers with different molar masses. Typically, 500 mg of a mixture of PHA and LA were added in a 10 mL MW-transparent quartz vial. The mixture was freeze-dried with 2 mL of anhydrous toluene overnight. Then, 0.5 mol % of $SnOct_2$ was added under a dried argon flow. Finally, the vial was subjected to MW irradiation at 115 °C during 5 min, and then cooled with compressed air to 50 °C. A calibrated infrared temperature sensor on the bottom of the vial was used to monitor the temperature profiles. The temperature ramp mode chosen corresponded to the application of a high initial MW power ($P \sim 200$ W within 40 s) up to reaching the set temperature as soon as possible to obtain a fast heating of the bulk. The MW power was then decreased to about 15 W to maintain the desired temperature. Once the process was complete, the as-polymerized product was dissolved in dichloromethane and precipitated in methanol at 0 °C. The resulting copolymer was filtered and dried under vacuum at 50 °C overnight so as to determine LA conversion by gravimetry.

Instrumentation

^{1}H and TOCSY NMR spectra were recorded at room temperature using a Bruker 400 MHz NMR spectrometer. $CDCl_3$ was used as the solvent and internal standard (7.27 ppm). SEC experiments were performed at room temperature using a Spectra Physics P100 pump, and two Polymer Laboratories PL-gel columns (5 μm Mixed-C). A Wyatt Technology Optilab rEX interferometric refractometer (RI) was used as the detector. $CHCl_3$ was used as the eluent at a flow rate of 1 mL min^{-1}, and polystyrene standards were employed for calibration. Differential scanning calorimetry (DSC) measurements were conducted on a Perkin Elmer Diamond calorimeter. The following protocol was used for each sample: first heating from −70 °C to 200 °C at 10 °C min^{-1}, fast cooling to −70 °C at 200 °C min^{-1}, and then second heating to 200 °C at 20 °C min^{-1}. TGA analyses were performed on a Setaram Setsys Evolution 16 apparatus, by heating the samples at a rate of 10 °C min^{-1} from 20 to 400 °C under argon atmosphere.

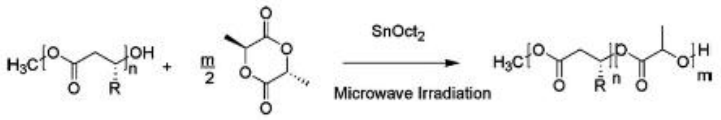
RESULTS AND DISCUSSION

The synthesis of well-defined diblock copolymers is critical for the preparation of novel materials and the understanding of their associated structure–property relationships. Hence, to prepare homopolymer-free diblock copolymers with defined block lengths and narrow molar mass distributions, the polymeric materials need to be synthesized through a controlled process. PHA-*b*-PLA diblock copolymers were prepared by MW-assisted ROP of LA initiated by the corresponding hydroxy-terminated PHA macroinitiators (Scheme 1).

Preparation of PHA Macroinitiators

First, low to moderate molar mass PHA macroinitiators were produced by methanolysis of native PHAs, thus leading to

JOURNAL OF POLYMER SCIENCE Polymer Chemistry WWW.POLYMERCHEMISTRY.ORG ARTICLE



R=CH_3 (0.88), C_2H_5 (0.12): PHBHV
R=CH_3 (0.91), C_3H_7 (0.09): PHBHHx
R=C_5H_{11} (0.85), C_3H_7 (0.15): PHOHHx

SCHEME 1 MW-assisted synthesis of PHA-*b*-PLA diblock copolymers.

the formation of oligoesters with a hydroxyl end-group for further initiation of the LA ROP. The rapid one-step production of such ester-terminated monohydroxylated PHA oligomers was implemented using anhydrous methanol and sulfuric acid used as a catalyst (Scheme 2).

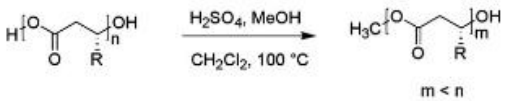
The methanolysis reactions of high molar mass PHBHV, PHBHHx, and PHO were ended at different times and the molar masses of the resulting products were determined by ^{1}H NMR and SEC. As shown in Table 1, it is noteworthy that the molar mass of produced PHA macroinitiators was controlled by adjusting the reaction time: the longer the reaction time, the lower the molar mass. The methanolysis reaction was allowed to proceed for 2–7 min to afford PHBHV and PHBHHx oligomers with a M_n value comprised between 15,000 and 2700 g mol^{-1}. Much longer times were needed to yield PHO oligomers of equivalent M_n, probably due to the longer side-chain length. While native PHAs possessed PDIs ranging from 1.5 to 2.4, the corresponding macroinitiators resulting from the methanolysis reaction exhibited PDI values around 2.0 (1.9–2.2). The methanolysis reaction via transesterification is known to proceed through a random chain-scission mechanism; therefore, the final PDI values always tended to 2.0, regardless of the molar mass of native PHAs and resulting oligoesters.[9]

Considering the potential thermal degradation of PHAs, methanolysis was carried out at 100 °C to avoid the formation of degradative products arising from a Mc Lafferty rearrangement (*β*- or *cis*-elimination).[43] One such thermal degradation generally results in the generation of a crotonate end-group. A close examination of the NMR spectra associated with the PHAs degraded by methanolysis clearly demonstrated the absence of any signal corresponding to an unsaturation, thus illustrating the effectiveness and versatility of the latter reaction as a straightforward route to well-defined PHA oligomers.

Evidence of Diblock Copolymer Structure

Four monohydroxylated PHBHV and PHBHHx macroinitiators with molar masses of 7000 and 12,000 g mol^{-1}, denoted respectively PHBHV$_{7000}$, PHBHV$_{12000}$, PHBHHx$_{7000}$, and PHBHHx$_{12000}$, were used to trigger the ROP of LA. The resulting block copolymers were synthesized via a MW-assisted procedure using $SnOct_2$ as a catalyst. The use of tin catalysts has been shown to produce high molar mass PLA with low PDIs and a minimum of side reactions. The mechanism associated with the ROP of LA is not supposed to be different from that of the conventional thermally induced process. It proceeds through a coordination-insertion mechanism, in which the first step entails the complexation between the catalyst ($SnOct_2$) and the alcohol initiating function (hydroxyl end-group of macroinitiators), and leads to the formation of a nucleophilic complex that attacks the polarized carbonyl group of the lactone monomer.[44] As polar compounds are known to be highly sensitive to MW absorption,[18–20] we can assume that all the polar groups and molecules involved in the ROP of LA can potentially be activated on MW irradiation, namely hydroxyl and carbonyl groups, as well as the catalyst.

The chemical structures of the obtained copolyesters were characterized by ^{1}H and TOCSY correlation NMR spectroscopy. Figure 1 shows the typical spectra associated with a PHBHV-*b*-PLA diblock copolymer. First, the ^{1}H NMR spectrum [Fig. 1(a)] was consistent with the structure of the expected copolymer with the PLA characteristic bands at 1.55 ppm (2, CH_3—CHO—) and at 5.18 ppm (1, —O—CH—CH_3), as well as the PHBHV characteristic bands at 5.3 ppm (b,b′, O—CH—), 2.4–2.6 ppm (a,a′, —CH_2—CH), and the side-chain signal at 1.26 ppm (c, CH_3—CHO), 0.87 ppm (c′, CH_3—CH_2) and 1.61 (d′, —CH_2—CH_3). A weak multiplet with a chemical shift at 4.3 ppm was assigned to the methine proton terminal unit from the PLA segment, whereas the singlet at 3.64 ppm corresponded to the methyl protons of the ester chain end-group. The TOCSY NMR experiment was also performed on the PHBHV-*b*-PLA block copolymer and clearly correlated protons interacting through *J* couplings [Fig. 1(b)]. One such analysis made it possible to establish a *J*5 correlation between the methine proton of the HB or HV unit directly linked to the PLA segment and the methine proton of the LA unit directly linked to the PHBHV block. This correlation was enhanced by a signal between both types of methine protons, thus demonstrating the true blockiness of the copolyesters synthesized with the



R=CH_3 (0.88), C_2H_5 (0.12): PHBHV
R=CH_3 (0.91), C_3H_7 (0.09): PHBHHx
R=C_5H_{11} (0.85), C_3H_7 (0.15): PHOHHx

SCHEME 2 Acid-catalyzed methanolysis of PHAs.

TABLE 1 Main Characteristics of PHA-Based Macroinitiators Obtained by Methanolysis of Corresponding Native PHAs

PHAs	t (min)	$M_{n,\ NMR}$[a] (g mol^{-1})	$M_{n,\ SEC}$[b] (g mol^{-1})	PDI[b]	Yield (%)	T_g[c] (°C)	T_m[d] (°C)	ΔH_m[d] (J g^{-1})
PHBHV	0	–	84,000	2.4	–	−2	153	69
	2.0	13,200	19,800	2.0	94	−6	156	70
	2.5	12,000	18,700	1.9	93	−6	155	70
	4.0	7000	10,500	1.9	92	−6	152	67
	7.0	2700	4200	2.0	90	−6	151	66
PHBHHx	0	–	206,000	1.7	–	−2	138	60
	2.0	15,200	21,200	2.1	91	−5	147	67
	2.5	12,000	17,800	2.2	90	−5	147	67
	4.0	7000	10,200	2.0	90	−6	143	66
	7.0	3500	4300	1.9	85	−7	141	65
PHOHHx	0	–	130,000	1.5	–	−40	53	27
	10.0	20,000	27,700	1.9	90	−40	50	19
	15.0	8000	8600	2.1	85	−40	47	24
	25.0	2900	4400	2.0	80	−48	–	–

[a] Determined by ^{1}H NMR.
[b] Determined by SEC-RI ($CHCl_3$, polystyrene standards), PDI = M_w/M_n.
[c] Determined by DSC in the second heating run.
[d] Determined by DSC in the first heating run.

occurrence of a single covalent linkage between PHA and PLA blocks.

Furthermore, Figure 2 displays the typical SEC traces of a PHA-based macroinitiator and the corresponding PHA-*b*-PLA copolymer. All SEC chromatograms of copolymers exhibited monomodal distributions narrower than those of PHA macroinitiators, indicating a controlled LA polymerization process on MW irradiation. Figure 2(a) shows a shift of the copolymer peak toward lower retention times, thus confirming the formation of a diblock copolymer. Indeed, after the ROP of LA, the molar mass distribution of the as-obtained copolymer shifted toward higher molar masses [Fig. 2(b)].

Influence of Temperature on MW-Assisted LA Polymerization

The first parameter investigated in the MW-assisted polymerization of LA initiated by a PHA macroinitiator was the set temperature. Figure 3 represents the variation of the conversion (p) and initiator efficiency ($f = M_{n,theor}/M_{n,exp}$ where $M_{n,theor}$ is the theoretical number-average molar mass and $M_{n,exp}$ is the experimental one determined by ^{1}H NMR) for the polymerization as a function of the set temperature. It is noteworthy that both f and p values decreased when increasing the temperature from 115 to 160 °C. First, the significant decrease of the efficiency from 0.95 at 115 °C to 0.46 at 160 °C indicated a loss of control over the MW-assisted synthesis of copolymers with tunable PHA/PLA compositions. A high initiator efficiency is of paramount significance to design diblock copolymers with a predetermined molar mass for the PLA block by ending the polymerization process at a given conversion. The efficiency decrease could be explained by the occurrence of a transesterification reaction when increasing the temperature. The bulk transesterification induced a reduction of the hydroxyl end-group concentration of the macroinitiator, and consequently led to an increase of the PLA molar mass, as can be shown by ^{1}H NMR (results not shown). Obviously enough, the higher the temperature, the more pronounced the contribution of transesterification. A set temperature of 115 °C permitted to avoid such a side reaction, while enabling initiator efficiency values close to 1.

On the other hand, Figure 3 reports on the decrease of conversion from 81% at 115 °C to 56% at 160 °C. This significant drop might arise from two potential side phenomena, at temperatures higher than 115 °C, namely the vaporization of $SnOct_2$ leading to a loss of its catalytic action, and/or the formation of free oligolactide chains that could not be precipitated in methanol.[45] With a set temperature of 115 °C, the polymerization conversion was not complete but high enough for selecting it as the optimal temperature to engineer the block copolymers. It should be stressed that it was not possible to lower the temperature below 115 °C because of a difficult melting of PHA macroinitiators.

Influence of Side-Chain Length of Macroinitiator on MW-Assisted LA Polymerization

The nature of PHA-based macroinitiators was particularly investigated to determine the influence of their side-chain length on the MW-assisted polymerization of LA. As a matter of fact, as shown in Scheme 2, PHA macroinitiators were formed with various side-chain aliphatic groups ranging from one to five carbon atoms. As PHBHV and PHBHHx contain about 90 mol % of hydroxybutyrate unit, they can be considered as short-chain length PHAs, whereas PHOHHx is considered as a medium-chain length PHA with a side-chain of mainly five carbon atoms. Table 2 summarizes the most significant results obtained for characteristic systems under investigation. It is noteworthy that both PHBHV- and PHBHHx-based systems exhibited initiator efficiency values

JOURNAL OF POLYMER SCIENCE Polymer Chemistry WWW.POLYMERCHEMISTRY.ORG ARTICLE

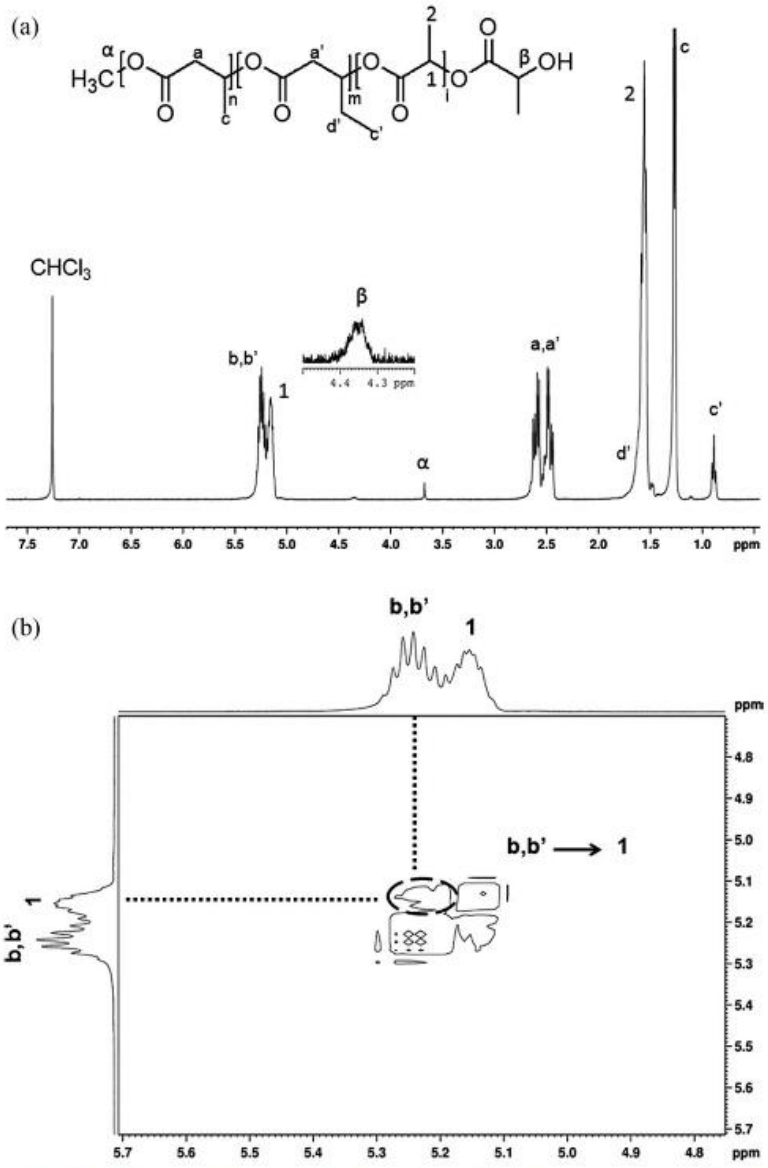


FIGURE 1 (a) ^{1}H NMR and (b) TOCSY spectrum of a typical PHBHV-*b*-PLA copolymer in $CDCl_3$.

(*f*) close to 1, along with LA conversions (*p*) higher than 80%. However, the LA initiation by a PHOHHx-based macroinitiator was less efficient, and a much smaller conversion was obtained. These lower values could well be attributable to the high steric hindrance in the close vicinity of the secondary alcohol function in the PHOHHx structure. Indeed, the PHOHHx side-chain length with mainly five carbon atoms could hinder the alcohol accessibility to the LA monomer. In sharp contrast, PHA macroinitiators with shorter side-chain length, such as PHBHV and PHBHHx, gave a better accessibility of the reactive function, thus inducing a higher conversion and nearly complete initiator efficiency. For further investigation, we decided to use PHBHV and PHBHHx macroinitiators only.

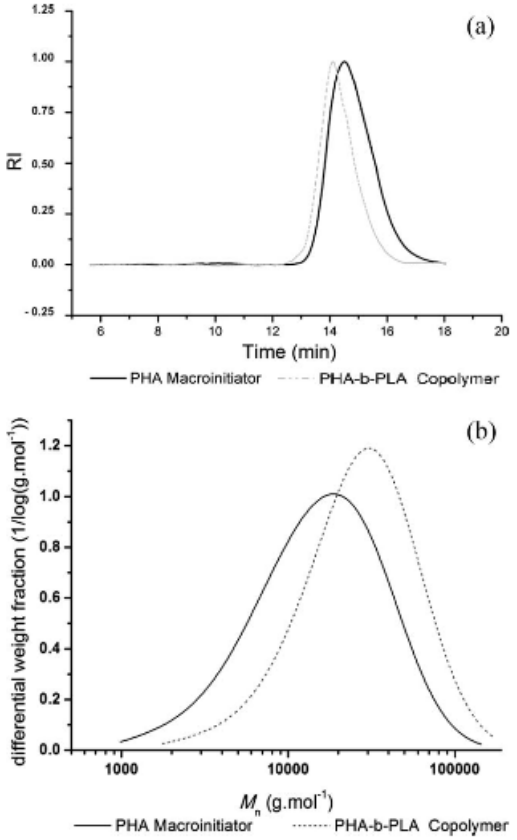


FIGURE 2 SEC traces for a typical LA polymerization initiated by a PHA-based macroinitiator (115 °C, 5 min, $[LA]_0/[PHBHHx_{7000}]_0$ = 250/1): (a) chromatograms from RI detection, (b) molar mass distribution profiles.

Influence of Irradiation Time on MW-Assisted LA Polymerization

The effect of MW irradiation time was investigated with a PHBHHx macroinitiator of 12,000 g mol^{-1} and a $[LA]_0/[PHBHHx]_0$ molar ratio of 250/1. Figure 4 shows two distinct phases with contrasted durations. First, the conversion and the molar mass of the copolymers dramatically increased when the reaction time varied from 40 s to 5 min with values ranging from 34 to 85% and from 25,900 g mol^{-1} to 43,800 g mol^{-1}, respectively. Such variations clearly indicated that the ROP of LA was not completed before 5 min. Second, the conversion and the molar mass built up very slowly or came to a standstill when the reaction time increased from 5 to 40 min. These variations could well be related to the mode of MW irradiation during the polymerization process. As a matter of fact, as illustrated in Figure 5, the temperature ramp mode involved the application of a high irradiation power at the onset of the polymerization ($P \sim 200$ W within 40 s) to heat the bulk very quickly, which accounted for the high LA conversion attained in the initial stage. This fast dielectric heating caused by the high level of MW irradiation generated a very homogeneous melt and a highly efficient heating of the reaction mixture.

It should be stressed that the infrared sensor measured the outside temperature of the vessel, thus leading to a misinterpretation and a lag between the true bulk temperature and the measured external one.[46] In contrast, Hosseini et al.[47] described a way to measure accurately the temperature by using a fiber optic probe inside the reaction vessel for directly monitoring and recording the internal reaction temperature. Noticeably, a MW irradiation is known to conduct to an inverted temperature gradient compared to conventional thermal heating: the bulk was heated first, and then the internal heating was transferred toward the outside reaction vessel.[46] Consequently, it can be assumed that the bulk temperature was significantly higher than the external temperature recorded by the infrared sensor. During the initial irradiation period, the application of the very high MW power thus implied the occurrence of internal temperatures over 115 °C and led to a rapid chain growth. Once the outside reaction vessel reached the target temperature (115 °C) within 90 s, the MW power was decreased to about 15 W to maintain the bulk temperature over the entire polymerization period. The level of MW irradiation being then very low, the heating was less efficient and the disappearance of the benefits of a bulk MW-assisted reaction, such as heating homogeneity, could be noticed with some difficulties to carry out solvent-free reactions. At that moment, a classical heating occurred with a bulk temperature of 115 °C; therefore, long reaction times were necessary to achieve a minor variation of conversion and molar mass (Fig. 4).

A kinetic investigation of the MW-assisted LA polymerization is illustrated in Figure 6. As shown in Figure 6(a), the Ln ($[M]_0/[M]$) *vs.* time plot exhibited two well-marked stages

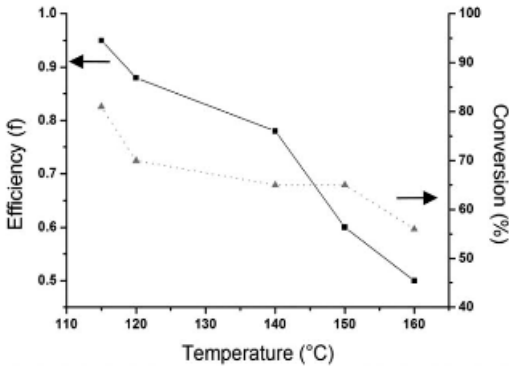


FIGURE 3 Influence of the set temperature on initiator efficiency and conversion for MW-assisted ROP of LA initiated by a PHA-based macroinitiator (t = 1 min, $[LA]_0/[PHBHV_{7000}]_0$ = 200/1).

TABLE 2 Main Characteristics of PHA-*b*-PLA Diblock Copolymers and Corresponding Microwave-Assisted Polymerizations of LA Initiated by PHA Macroinitiators[a]

Macroinitiator	M_n (macroinitiator) (g mol^{-1})	$M_{n,\ theoretical}$[b] (g mol^{-1})	$M_{n,\ NMR}$[c] (g mol^{-1})	$M_{n,\ SEC}$[d] (g mol^{-1})	PDI[d]	p[e] (%)	f[f]
PHBHV	7000	36,900	37,400	16,600	1.7	83	0.99
PHBHV	8500	39,500	42,700	21,800	1.6	85	0.95
PHBHHx	7000	38,000	38,200	19,400	1.6	86	0.99
PHOHHx	2900	13,800	15,800	19,000	1.4	30	0.87

[a] Experimental conditions: $T = 115$ °C, $t = 5$ min, $[LA]_0/[PHA]_0 = 250/1$.
[b] $M_n = M_{n,macroinitiator} + [LA]_0/[PHA]_0 \times M_{LA} \times p$.
[c] Determined by ^{1}H NMR.
[d] Determined by SEC-RI ($CHCl_3$, polystyrene standards).
[e] LA conversion as determined by gravimetry.
[f] $f = M_{n,\ theoretical}/M_{n,\ NMR}$.

with completely different polymerization rate constants. The two-step procedure of MW irradiation during the reaction could well account for such results (Fig. 5). The high irradiation power providing a considerable level of energy at the beginning of the ROP process implied a highly homogeneous and efficient heating, as previously explained. Moreover, the melt temperature of the reaction medium was much higher than the external measured infrared temperature and still increased during the first irradiation step, thus leading to a first linear kinetic variation of $\mathrm{Ln}([M]_0/[M])$ *vs.* time with a relatively high slope. Once the target temperature reached, the second step started with a low level of irradiation to maintain the bulk at 115 °C, and consequently the bulk was not heated as efficiently as in the initial stage, thus giving rise to a second linear kinetic variation of $\mathrm{Ln}([M]_0/[M])$ *vs.* time with a much lower slope. As a result, the propagation rate constants (k_p)—determined from the slopes of the first-order kinetic plots—were found to be equal to 5.14×10^{-1} and 8.67×10^{-3} L mol^{-1} s^{-1}, respectively. Kinetic constants strongly depend on the temperature of the reaction, so in turn on the MW irradiation power provided during the polymerization process. Accordingly, the first rate constant was almost one hundred times as high as the second one. Control over copolymer chain growth was observed in Figure 6(b) featuring a linear variation of the molar masses with LA conversion. In addition, the decrease of the PDI as a function of conversion was demonstrated. The kinetic data combined with the variations of the molar masses and their distributions determined for the synthesized copolymers provided the experimental evidence of the "living"/controlled character associated with the mechanism of MW-assisted LA polymerization under the experimental conditions selected.

To corroborate this assertion, a PEG monomethyl ether sample with low PDI (PEG, $M_n = 5000$ g mol^{-1}, PDI = 1.1) was used as a macroinitiator for LA polymerization under otherwise identical conditions. Three PEG-*b*-PLA diblock copolymers were thus obtained with molar masses ranging from 10,500 to 30,000 g mol^{-1}, namely in good agreement with the values predicted by the $[LA]_0/[PEG]_0$ ratios, and with PDIs as low as 1.2–1.3.

MW-Assisted Synthesis of PHA-*b*-PLA Copolymers Using Different $[LA]_0/[PHA]_0$ Molar Ratios

Miscellaneous copolymers with different compositions were synthesized by MW-assisted ROP of LA with a reaction time of 5 min and a set temperature of 115 °C. One such polymerization was initiated using various PHA-based macroinitiators with varying chemical structures and molar masses: $PHBHV_{7000}$ ($M_n = 7000$ g mol^{-1}, PDI = 1.9), $PHBHV_{12000}$ ($M_n = 12{,}000$ g mol^{-1}, PDI = 1.9), $PHBHHx_{7000}$ ($M_n = 7000$

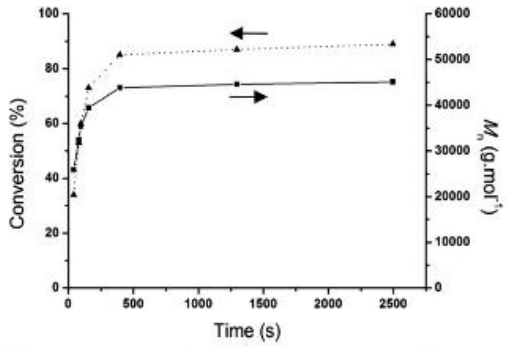


FIGURE 4 Dependence of LA conversion and molar mass of diblock copolymers on the irradiation time (115 °C, $[LA]_0/[PHBHHx_{12000}]_0 = 250/1$).

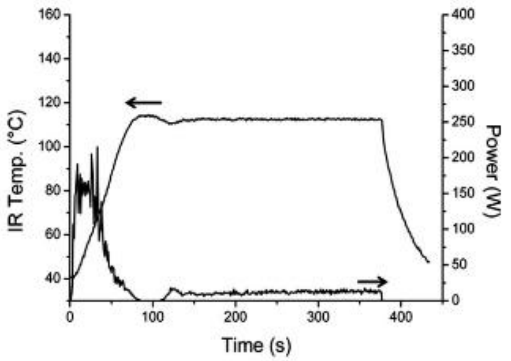


FIGURE 5 Typical temperature and power profiles during MW irradiation at 115 °C for 5 min.

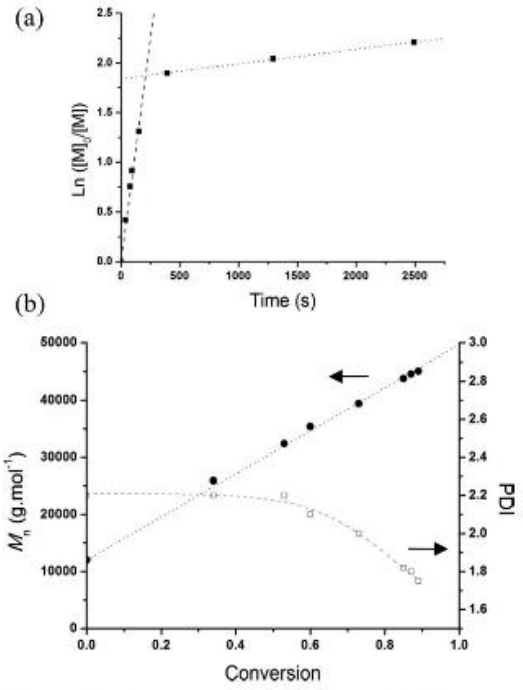


FIGURE 6 MW-assisted polymerization of LA initiated by a PHA-based macroinitiator (115 °C, $[LA]_0/[PHBHHx_{12000}]_0$ = 250/1): (a) kinetic plot of Ln($[M]_0/[M]$) *vs.* time, (b) dependence of molar mass (M_n) and PDI on LA conversion.

g mol^{-1}, PDI = 2.0), and $PHBHHx_{12000}$ (M_n = 12,000 g mol^{-1}, PDI = 2.2). Three $[LA]_0/[PHA]_0$ molar ratios (60/1, 130/1, 250/1) were used to fine-tune the length of the PLA block with each PHA-based macroinitiator. Table 3 summarizes the main characteristics associated with the resulting diblock copolymers and the related MW-assisted polymerization processes. Under the experimental conditions investigated, diblock copolymers with M_n values ranging from 13,750 g mol^{-1} to 45,400 g mol^{-1} and PDIs varying from 1.5 to 1.9 were obtained. Although these PDI values were relatively high, they were lower than those associated with the initial macroinitiators.

For the highest $[LA]_0/[PHA]_0$ molar ratios, that is, the lowest concentrations of PHA-based macroinitiators, the molar masses of the synthesized copolymers were the largest, as expected. It is noteworthy that the M_n values determined by ^{1}H NMR increased almost linearly with increasing the $[LA]_0/[PHA]_0$ molar ratio. Furthermore, a very important parameter was the initiator efficiency (f) whose values were very close to 1 (between 0.91 and 0.99 for both macroinitiators used). Such high values corroborated the true blockiness associated with the copolyesters, regardless of the molar mass and the chemical structure of the PHA-based macroinitiator. The conversion values ranged from 52 to 86%: the lower the $[LA]_0/[PHA]_0$ molar ratio, the lower the conversion. The moderate conversion values obtained for the lowest $[LA]_0/[PHA]_0$ molar ratios could be attributed to a difficult melting of the bulk, due to the high concentration of PHA associated with a high viscosity. Consequently, the LA polymerization slowed down, so in turn the conversion was relatively low. Higher conversions were reached when the PHA-based macroinitiator concentration was lower, due to the easier melting of the bulk constituted of a large fraction of LA (T_m = 119 °C). As a conclusion, the high initiator efficiency values conjugated with the variations of the M_n and PDI values confirmed the controlled character of the MW-assisted LA polymerization initiated by PHA macroinitiators.

TABLE 3 Characteristics of PHA-*b*-PLA Diblock Copolymers Obtained by Microwave-Assisted Ring-Opening Polymerization of LA Initiated by PHA Macroinitiators[a]

Macroinitiator	$[LA]_0/[PHA]_0$ (mol)	$M_{n,\ theoretical}$[b] (g mol^{-1})	$M_{n,\ NMR}$[c] (g mol^{-1})	$M_{n,\ SEC}$[d] (g mol^{-1})	PDI[d]	p[e] (%)	f[f]
$PHBHV_{7000}$	60/1	12,700	13,750	13,200	1.7	65	0.92
$PHBHV_{7000}$	130/1	22,500	23,600	15,000	1.8	83	0.95
$PHBHV_{7000}$	250/1	36,900	37,400	16,600	1.7	83	0.99
$PHBHV_{12000}$	60/1	15,600	17,400	13,300	1.9	52	0.94
$PHBHV_{12000}$	130/1	24,700	26,300	17,000	1.9	74	0.92
$PHBHV_{12000}$	250/1	40,400	45,400	18,100	1.8	85	0.94
$PHBHHx_{7000}$	60/1	12,700	14,000	16,900	1.5	66	0.91
$PHBHHx_{7000}$	130/1	22,000	24,000	15,800	1.7	80	0.92
$PHBHHx_{7000}$	250/1	38,000	38,200	19,400	1.6	86	0.99
$PHBHHx_{12000}$	60/1	16,500	17,400	18,800	1.8	52	0.95
$PHBHHx_{12000}$	130/1	27,500	28,000	20,300	1.8	83	0.98
$PHBHHx_{12000}$	250/1	41,500	43,400	21,100	1.8	82	0.96

[a] Experimental conditions: T = 115 °C, t = 5 min.
[b] $M_n = M_{n,macroinitiator} + [LA]_0/[PHA]_0 \times M_{LA} \times p$.
[c] Determined by ^{1}H NMR.
[d] Determined by SEC-RI ($CHCl_3$, polystyrene standards).
[e] LA conversion as determined by gravimetry.
[f] $f = M_{n,\ theoretical}/M_{n,\ NMR}$.

JOURNAL OF POLYMER SCIENCE Polymer Chemistry WWW.POLYMERCHEMISTRY.ORG ARTICLE

TABLE 4 Thermal and Structural Characteristics of PHA-*b*-PLA Copolymers as Investigated by DSC and TGA

Copolymer	$[LA]_0/[PHA]_0$ (mol)	T_g[a] (°C)	T_g(PLA)[b] (°C)	T_m[b] (°C)	ΔH_m[b] (J g^{-1})	PLA content[c] (wt %)	PLA content[d] (wt %)
PHBHV7000	60/1	7	48	147	33	49	50
PHBHV7000	130/1	12	52	145	24	70	68
PHBHV7000	250/1	22	53	144	12	81	78
PHBHV12000	60/1	2	–	151	36	30	31
PHBHV12000	130/1	12	53	149	26	55	57
PHBHV12000	250/1	20	55	147	19	73	71
PHBHHx7000	60/1	11	40	138	17	50	50
PHBHHx7000	130/1	18	43	133	16	70	68
PHBHHx7000	250/1	26	45	128	8	81	79
PHBHHx12000	60/1	2	–	142	32	31	31
PHBHHx12000	130/1	9	33	138	22	57	55
PHBHHx12000	250/1	20	49	126	14	72	72

[a] Determined by DSC in the second heating run.
[b] Determined by DSC in the first heating run.
[c] Calculated from ^{1}H NMR spectra.
[d] Determined by TGA analyses.

To emphasize the efficiency and versatility of the MW-assisted ROP of lactide in the design of well-defined block copolyesters, it is important to highlight that MW irradiation enabled very short reaction times (typically a few minutes) associated with quite high conversions (50–85%), regardless of the macroinitiator characteristics. As a matter of fact, the application of a high irradiation power applied at the polymerization onset ($P \sim 200$ W within 40 s) induced an extremely rapid dielectric heating, thus generating a highly efficient heating of the reaction mixture. For the sake of comparison, we can mention the much longer polymerization durations used by Schreck et al.[16] in the generation of similar diblock copolyesters through the conventional thermally induced ROP of lactide: several hours (7–21 h) were needed to reach high conversions (85%) at 100 °C.

Thermal Properties of PHA-*b*-PLA Copolymers

DSC analyses were performed on PHA-*b*-PLA diblock copolymers (Table 4). The first heating scans showed endothermic peaks whose maximum values ranged from 144 to 151 °C and 126 to 142 °C, corresponding to the melting of PHBHV and PHBHHx crystalline phases, respectively. These T_m values agreed rather well with those associated with the corresponding PHA macroinitiators (see Table 1). As expected, the melting temperatures and enthalpies (ΔH_m) were higher for PHBHV-based copolymers because of its shorter side-chain, thus facilitating the crystallization. Moreover, it is noteworthy that the T_m and ΔH_m values decreased with increasing the length of the PLA block. These depressions resulted from the lowering of the material crystallinity with the incorporation of amorphous PLA sequences. It is thus logical that the longer the PLA block, the more disrupted the PHA crystallization. During the first heating scan, the PLA glass transition temperature (T_g) was observed at approximately 50 °C when the PLA block was long enough. However, the T_g associated with the PHA block could not be detected, probably due to the low proportion of the amorphous phase of these bacterial polyesters. Accordingly, a phase separation might occur in PHA-*b*-PLA copolymers. In sharp contrast, when the copolymer samples underwent the second heating run, the T_g of PLA disappeared, and a much lower T_g value was solely determined between 2 °C and 26 °C. This value actually rose as the PLA block increased, regardless of the macroinitiator characteristic. Interestingly, it seemed that a very fast quenching after the first heating of PHA-*b*-PLA diblock copolymers led to the isolation of frozen materials. This solid-state metastable morphology permitted to kinetically trap the PLA and PHA chain segments as one miscible phase without any microphase separation, as previously described by Reeve et al.[14] for poly(3-hydroxybutyrate)-*block*-poly(L-lactide) diblock copolymers.

To get further insight into these interesting results, a slow cooling after the first heating scan was performed on a copolymer sample, and a DSC analysis was also conducted on a 50/50 wt % binary blend of PHBHV (M_n = 10,000 g mol^{-1}) and PLA (M_n = 10,000 g mol^{-1}) homopolymers. Both analyses showed a microphase separation with two T_g values corresponding to the amorphous phase of each homopolymer (results not shown). Consequently, the fast cooling after the first heating run was responsible for the occurrence of a kinetically frozen metastable state in PHA-*b*-PLA copolymers characterized by a sole T_g whose value was intermediate between those of both corresponding homopolymers.

The thermal stability of the diblock copolymers was evaluated by TGA under dynamic argon atmosphere. Figure 7 displays the thermal degradation profile of $PHBHHx_{12000}$ macroinitiator, $PHBHHx_{12000}$-*b*-PLA, and PLA homopolymer. First, it is noteworthy that the copolymer begun to degrade at a temperature above 190 °C. The copolymer exhibited a two-step degradation behavior with the first step occurring between 195 and 250 °C, followed by the second step from 260 to 280 °C. Thanks to the thermal degradation profiles of the PLA and $PHBHHx_{12000}$ macroinitiator, the first step could

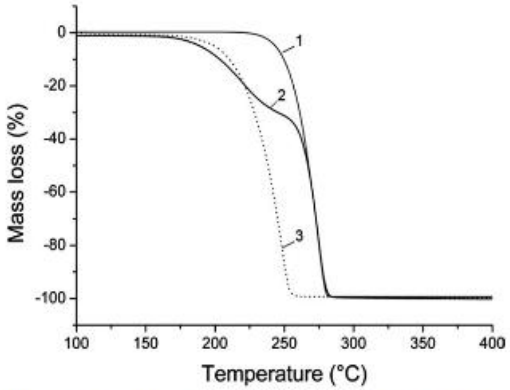


FIGURE 7 Typical mass loss curves from TGA for PHBHHx macroinitiator (1), $PHBHHx_{12000}$-*b*-PLA copolymer (2) (experimental conditions of synthesis: 115 °C, 5 min, $[LA]_0/[PHBHHx]_0 = 60/1$), and PLA homopolymer (3).

be attributed to the degradation of the PLA sequence while the second stage to the $PHBHHx_{12000}$ block destruction. Through such an analysis, it was possible to confirm the composition of PHA and PLA in the diblock copolymers. The results are listed in Table 4; they were in good agreement with those obtained by ^1H NMR. A complete characterization was thus carried out on the synthesized copolymers with well-defined structures.

CONCLUSIONS

This report has demonstrated the efficiency and versatility of MW-assisted ROP as a rapid, inexpensive, and straightforward route to well-defined PHA-*b*-PLA diblock copolymers with tunable compositions. First, miscellaneous hydroxy-terminated PHA oligomers with varying molar masses were prepared by acid-catalyzed methanolysis of corresponding native PHAs. Second, such oligoesters were used as macroinitiators for the bulk ROP of LA to generate diblock copolyesters with controlled block lengths, on MW irradiation. At 115 °C, initiator efficiency values close to 1 were found. Besides, the linear variations of $Ln([M]_0/[M])$ versus time and M_n versus conversion, along with the decrease of the PDI with conversion, gave evidence of the "livingness" associated with the mechanism of MW-assisted LA polymerization under the experimental conditions selected. It is important to point out that MW irradiation enabled very short reaction times (typically a few min) associated with relatively high conversions (50–85%). As a matter of fact, the application of a high irradiation power at the onset of the polymerization ($P = 200$ W within 40 s) may well account for these remarkable results. The high level of MW irradiation induced an extremely rapid dielectric heating, thus generating a very homogeneous melt and a highly efficient heating of the reaction mixture.

Due to their great benefits, including high yields, short reaction times, and ease of conducting bulk reactions, we believe that MW-assisted procedures will gain increasing interest in macromolecular engineering through the synthesis of miscellaneous well-defined architectures.

The authors thank the French Ministry of Research for providing Julien Ramier with a grant. They are also indebted to Dr. F. Henry (CNRS, Thiais, France) for helpful discussions on microwave irradiation processes.

REFERENCES

1 Vert, M. *Biomacromolecules* **2005,** *6*, 538–546.
2 Zinn, M.; Witholt, B.; Egli, T. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001,** *53*, 5–21.
3 Sparks, J.; Scholz, C. *Biomacromolecules* **2009,** *10*, 1715–1719.
4 Lenz, R. W.; Marchessault, R. H. *Biomacromolecules* **2005,** *6*, 1–8.
5 Degradable Polymers and Materials, Principle and Practice; Khemani, K., Scholz, C., Eds.; ACS Symposium Series *939*: Washington, DC, **2006.**
6 Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y. *Prog. Polym. Sci.* **2000,** *25*, 1503–1555.
7 Williams, S. F.; Martin, D. P.; Horowitz, D. M.; Peoples, O. P. *Int. J. Biol. Macromol.* **1999,** *25*, 111–121.
8 Babinot, J.; Renard, E.; Langlois, V. *Macromol. Chem. Phys.* **2011,** *212*, 278–285.
9 Timbart, L.; Renard, E.; Tessier, M.; Langlois, V. *Biomacromolecules* **2007,** *7*, 1255–1265.
10 Li, S.; McCarthy, S. *Biomaterials* **1999,** *20*, 35–44.
11 Huang, M.; Li, S.; Coudane, J.; Vert, M. *Macromol. Chem. Phys.* **2003,** *204*, 1994–2001.
12 Abayasinghe, N. K.; Smith, Jr. D. W. *Macromolecules* **2003,** *36*, 9681–9683.
13 Anderson, K. S.; Lim, S. H; Hillmyer, M. A. *J. Appl. Polym. Sci.* **2003,** *89*, 3757–3768.
14 Reeve, M. S.; McCarthy, S. P.; Gross, R. A. *Macromolecules* **1993,** *26*, 888–894.
15 Hiki, S.; Miyamoto, M.; Kimura, Y. *Polymer* **2000,** *41*, 7369–7379.
16 Schreck, K. M.; Hillmyer, M. A. *J. Biotechnol.* **2007,** *132*, 287–295.
17 Wu, L.; Chen, S.; Li, Z.; xu, K.; Chen, G.-Q. *Polym. Int.* **2008,** *57*, 939–949.
18 Sosnik, A.; Gotelli, G.; Abraham, G. A. *Prog. Polym. Sci.* **2011,** *36*, 1050–1078.
19 Gedye, R.; Smith, F.; Westaway, K.; Ali, H.; Baldisera, L.; Laberge, L.; Rousell, J. *Tetrahedron Lett.* **1986,** *27*, 279–282.
20 Giguere, R. J.; Bray, T. L.; Duncan, S. M.; Majetich, G. *Tetrahedron Lett.* **1986,** *27*, 4945–4958.
21 Hoogenboom, R.; Schubert, U. S. *Macromol. Rapid Commun.* **2007,** *28*, 368–386.
22 Ebner, C.; Bodner, T.; Stelzer, F.; Wiesbrock, F. *Macromol. Rapid Commun.* **2011,** *32*, 254–288.
23 Kempe, K.; Becer, C. R; Schubert, U. S. *Macromolecules* **2011,** *44*, 5825–5842.
24 Nagahata, R.; Sano, D.; Suzuki, H.; Takeuchi, K. *Macromol. Rapid Commun.* **2007,** *28*, 437–442.
25 Keki, S.; Bodnár, I.; Borda, J.; Deák, G.; Zsuga, M. *Macromol. Rapid Commun.* **2001,** *22*, 1063–1065.
26 Munteanu, M.; Choi, S.; Ritter, H. *Macromolecules* **2008,** *41*, 9619–9623.

27 Rigolini, J.; Grassl, B.; Billon, L.; Reynaud, S.; Donard, O. F. X. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2009,** *47*, 6919–6931.

28 Roy, D.; Ullah, A.; Sumerlin B. D. *Macromolecules* **2009,** *42*, 7701–7708.

29 Hoogenboom, R.; Wiesbrock, F. D.; Leenen, M. A. M.; Meier, M. A. R.; Schubert, U. S. *J. Comb. Chem.* **2005,** *7*, 10–13.

30 Liao, L. Q.; Liu, L. J.; Zhang, C.; He, F.; Zhuo, R. X.; Wan, K. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2002,** *40*, 1749–1755.

31 Fang, X.; Simone, C. D.; Vaccaro, E.; Huang, S. J.; Scola, D. A. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2002,** *40*, 2264–2275

32 Zhang, C.; Liao, L.; Liu, L. J. *Macromol. Rapid Commun.* **2004,** *25*, 1402–1405.

33 Wiesbrock, F.; Hoogenboom, R.; Leenen, M. A. M.; Meier, M. A. R.; Schubert, U. S. *Macromolecules* **2005,** *38*, 5025–5034.

34 Guerrero-Sanchez, C.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S. *Chem. Commun.* **2006,** *36*, 3797–3799.

35 Nan, A.; Turcu, R.; Craciunescu, I.; Pana, O.; Scharf, H.; Liebscher, J. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2009,** *47*, 5397–5404.

36 Lobert, M.; Hoogenboom, R.; Fustin, C. A.; Gohy, J. F.; Schubert, U. S. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2008,** *46*, 5859–5868.

37 Zhang, C.; Liao, L.; Gong, S. *Macromol. Chem Phys.* **2007,** *208*, 1122–1128.

38 Zhang, C.; Liao, L.; Gong, S. *Macromol. Rapid Commun.* **2007,** *28*, 422–427.

39 Yu, Z. J.; Liu, L. J. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2005,** *16*, 957–971.

40 Anzovino, M. B.; Rutledge, K. E.; Baron, M. A.; Goh S. L. *Polym. Preprints* **2006,** *47*, 587–588.

41 Hartmann, R.; Hany, R.; Geiger, T.; Egli, T.; Witholt, B.; Zinn, M. *Macromolecules* **2004,** *37*, 6780–6785

42 Timbart, L.; Renard, E.; Langlois, V.; Guérin, P. *Macromol. Biosci.* **2004,** *4*, 1014–1020.

43 Ariffin, H.; Nishida, H.; Shirai, Y.; Hassan, M. A. *Polym. Degrad. Stab.* **2008,** *93*, 1433–1439.

44 Kowalski, A.; Duda, A.; Penczek, S. *Macromolecules* **2000,** *33*, 7359–7370.

45 Zhang, C.; Liao, L.; Liu, L. *Macromol. Rapid Commun.* **2004,** *25*, 1402–1405.

46 Herrero, M. A.; Kremsner, J. M.; Kappe, C. O. *J. Org. Chem.* **2008,** *73*, 36–47.

47 Hosseini, M.; Stiasni, N.; Barbieri, V.; Kappe, C. O. *J. Org. Chem.* **2007,** *72*, 1417–1424.

2.3. L'apport du chauffage par micro-ondes

2.3.1. Production d'oligoesters sous activation par micro-ondes

La production d'oligomères de PHAs représente un défi intéressant et de grande envergure dans le but de développer de nouvelles architectures incorporant des produits issus de ressources renouvelables.

La dégradation contrôlée des PHAs peut être réalisée par diverses approches telles que par des hydrolyses enzymatiques, acides, basiques, par des alcoolyses, par dégradation thermique ou encore par des réactions de transestérification.[9-12] En fonction de la méthode de dégradation, les structures des oligomères générés peuvent comprendre différentes fonctionnalités telles qu'une insaturation crotonique et une fonction acide carboxylique à chaque extrémité de chaîne dans le cas de la dégradation thermique. Cette méthode peut être considérée comme un moyen efficace pour la production d'oligoesters en raison de l'absence de catalyseur, de solvant ainsi que la formation de fonctions réactives. Cependant, la dégradation thermique par chauffage conventionnel (conduction/convection) est un processus lent qui implique des protocoles de plusieurs heures afin d'obtenir des oligomères de PHAs de faibles masses molaires.

Dans ce contexte, nous avons développé pour la première fois une technique prometteuse de production d'oligoesters de PHAs qui consiste en la dégradation thermique par un chauffage diélectrique sous micro-ondes qui est connu pour chauffer les matériaux de manière très efficace et homogène. Au cours de ce travail, nous avons suivi par SEC et RMN ^{1}H l'évolution de la masse molaire de divers PHAs en fonction du temps d'irradiation, de la température et de la puissance d'irradiation afin de déterminer les conditions optimales. D'autre part, nous avons démontré que l'irradiation sous micro-ondes permet de réduire considérablement les temps de réaction avec des cinétiques 100 fois plus rapides en comparaison avec un chauffage conventionnel. De plus, les études ont montré que les structures chimiques des oligoesters formés sont tout à fait similaires pour les deux méthodes de chauffage.

ARTICLE n°2

Polymer Degradation and Stability 97 (2012) 322–328

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Polymer Degradation and Stability

journal homepage: www.elsevier.com/locate/polydegstab

Toward the controlled production of oligoesters by microwave-assisted degradation of poly(3-hydroxyalkanoate)s

Julien Ramier, Daniel Grande, Valérie Langlois, Estelle Renard*

Equipe "Systèmes Polymères Complexes", Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est, UMR 7182 CNRS Université Paris-Est Créteil, 2 rue Henri Dunant, 94320 Thiais, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 July 2011
Received in revised form
9 December 2011
Accepted 18 December 2011
Available online 23 December 2011

Keywords:
Poly(3-hydroxyalkanoate)s
Conventional thermal degradation
Microwave-assisted degradation
PHA oligomers

ABSTRACT

The degradation of poly(3-hydroxyalkanoate)s (PHAs) could be performed in a rapid, inexpensive and straightforward way *via* microwave irradiation with good potential for further scale-up. One such degradation was compared to that induced by conventional heating at 190 °C. The experimental results showed that PHA oligomers with varying molar masses, characterized by a terminal crotonic double bond and a carboxyl group on the other chain end, could be effectively obtained from native PHAs in the bulk by both degradation approaches. The kinetics of PHA oligomer production was monitored by size exclusion chromatography and ^{1}H NMR. The influence of temperature as well as microwave irradiation time and power was investigated, and the optimal conditions of degradation are described. It turned out that this treatment was much more efficient than a conventional thermally-induced degradation, as oligomers with similar molar masses were formed with an about 100 times faster rate corresponding to very short irradiation times (maximum 15 min). Two microwave-assisted procedures could be advantageously used: an irradiation with constant temperature was appropriate to afford PHA oligomers with molar masses lower than 1000 g.mol^{-1} and high yields, while irradiation under constant power was more convenient to provide oligoesters with higher molar masses.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Poly(3-hydroxyalkanoate)s (PHAs) have been suggested as green substitutes for conventional plastics, due to their synthesis from renewable resources and their biodegradation by enzymatic action. PHAs constitute a large class of aliphatic polyesters that are produced by many bacteria as intracellular carbon and energy storage materials [1–3]. Particular interest in PHAs originates from their biodegradability and biocompatibility [4,5], as well as their physical properties ranging from thermoplastic to elastomeric.

Over one hundred PHA compositions have been reported in the literature. Various structural units containing short, medium, long alkyl or functional side groups can be incorporated into polyesters generated by bacterial polymerization systems [6–16]. These polymers have a wide range of performance characteristics. Nevertheless, the widespread commercialization of PHA biopolymers is often limited by insufficient yields and mechanical properties. To develop their potential applications, PHAs can be used as building block intermediates for engineering families of useful or potentially useful products. In this regard, PHAs can be converted into low molar mass oligomers containing reactive end groups, and further used as building blocks for copolymerization reactions, yielding new block copolymers with improvement properties. Several studies have hitherto been identified and confirmed the available array of potential PHA oligomers that can be proposed to be a source of reactive oligoesters [17–21].

The controlled degradation of PHAs has been discussed in many previous reports by resorting to various approaches, *i.e.*, enzymatic hydrolysis, thermal degradation, alkaline hydrolysis, acid-catalyzed hydrolysis, methanolysis or transesterification [22–32]. The chemical structure of the resulting oligomers is very much dependent on the degradation method used. For instance, acid-catalyzed hydrolysis yields linear oligomers with a hydroxyl group at one end and a carboxyl group on the other end, along with very low proportions of cyclic structures. Alkaline conditions lead to the formation of oligomers containing a hydroxyl end group and an ester end group. Another example concerns the preparation of dihydroxy-telechelic PHA through a transesterification procedure with ethylene glycol. Among the different ways of degradation used for PHAs, the thermal treatment is probably the most described especially for *scl*-PHAs (which contain short-chain length alkanoate monomeric units), such as poly(3-hydroxybutyrate) (PHB). It is well established that the thermal degradation of PHAs occurs almost exclusively by a non-radical, random chain scission reaction involving a six-membered

* Corresponding author. Tel.: +33 0 1 49 78 12 17; fax: +33 0 1 49 78 12 08.
E-mail addresses: renard@icmpe.cnrs.fr, renard@glvt-cnrs.fr (E. Renard).

0141-3910/$ see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.polymdegradstab.2011.12.009

cyclic transition state [25]. The predominant reaction pathway is a stereoselective *cis*-elimination giving rise to the formation of trans-crotonic acid along with PHA oligomers. The as-obtained oligomers contain an unsaturated crotonic end group resulting from this *cis*-elimination reaction (Mc Lafferty rearrangement) and a carboxyl group on the other chain end.

Even though the thermal degradation can be considered as an efficient route to PHA oligomers due to the absence of catalyst and solvent, a promising degradation method seems to be microwave irradiation, which is known to heat materials very efficiently [33]. Over the last decade, the use of microwave irradiation to carry out chemical reactions much faster than conventional heating has expanded [34,35]. However, to the best of our knowledge, the microwave-assisted degradation of PHAs has not been investigated so far.

In this context, the present paper is concerned with the unprecedented oligoester production upon microwave irradiation (MW) of a series of native PHAs in the bulk. This degradation reaction is compared to that under conventional thermal heating in view of the evolution of PHA molar masses as monitored by SEC and ^{1}H NMR. In particular, we demonstrate the advantage of MW in reducing dramatically reaction times, while enabling the same structure of produced oligomers. This degradation method appears to be an attractive alternative to obtain reactive PHA oligomers which can further be used as building blocks in the design of novel macromolecular architectures.

2. Experimental section

2.1. Materials

PHB and poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) (PHBHV) (12 mol-% of 3HV units) were purchased from Aldrich, while poly(3-hydroxyoctanoate-*co*-3-hydroxyhexanoate) (PHOHHx) (15 mol-% of HHx units) was kindly supplied by EMPA (Switzerland). PHOHHx was biosynthesized by *Pseudomonas* sp.Gpo1 using sodium octanoate as carbon source as described in previous reports [36,37]. Bacterial polyesters were extracted from lyophilized cells with chloroform in a Soxhlet extractor, and then purified by precipitation in methanol.

2.2. Degradation upon microwave irradiation and conventional heating

All degradation experiments were performed in the bulk.

0.5 g of PHA was placed in a quartz glass tube; the degradation was performed under microwave irradiation in a monowave 300 microwave synthesis reactor from Anton Paar. The microwave source was a magnetron with a 2.5 GHz frequency powered by a 900 W power generator, which could be operated at different power levels. The vials were closed with a silicon cap using a pressure monitor unit, and placed into the reactor. For the reactions performed with constant temperature, the microwave reactor was programmed to maintain a constant temperature by adjusting the applied power. Consequently, after a fast initial heating of the reaction medium, the applied power level was rather low. The vials were heated up to the desired reaction temperature (180, 200 or 220 °C), and after a certain time interval, the samples were collected and cooled down by immersing them into an ice bath to fully stop the reaction.

Microwave irradiation under a constant power was carried out to investigate the effect of the power level. The microwave power ranged from 50 to 100 W, and it was adjusted to be kept constant during sample irradiation. The samples were heated continuously or cooled with compressed air to avoid overheating (a maximum set temperature was fixed).

For the sake of comparison, reactions were carried out with conventional heating using a classical thermal oven. 4 g of starting material were loaded into a Petri dish and were heated for a chosen reaction time and temperature. Then, the sample was cooled to room temperature.

2.3. Analytical techniques

2.3.1. Size exclusion chromatography

Average molar masses were determined by SEC using a Spectra Physics P100 pump with two PL gel-type columns connected in series (5 μm Mixed-C) from Polymer Laboratories. A Wyatt Technology Optilab rEX interferometric refractometer was used as the detector. $CHCl_3$ was used as the eluent at a flow rate of 1 mL.min^{-1}, and polystyrene standards were employed for calibration. The samples were dissolved at a concentration of 10 mg·mL^{-1} in $CHCl_3$.

2.3.2. Nuclear magnetic resonance spectroscopy

^{1}H NMR spectra were recorded on a Bruker 400 MHz spectrometer at room temperature. $CDCl_3$ was used as the solvent and the internal standard (7.24 ppm).

2.3.3. DSC analysis

Samples with masses of 8–12 mg were weighted into aluminium pans and were analyzed using a DSC-2010 calorimeter from TA Instruments under nitrogen atmosphere. The samples were first scanned from - 20 °C to 170 °C with a heating rate of 10 °C·min^{-1}, then cooled to - 70 °C very rapidly (at 200 °C.min^{-1}), and they were scanned immediately heated again to 170 °C with a heating rate of 20 °C·min^{-1} to avoid crystallization. The glass transition temperature (T_g) was taken as the value associated with the midpoint of the glass transition zone in the second heating run. The melting temperature (T_m) was taken as the maximum value of the endothermic peak in the first run.

2.3.4. Thermogravimetric analysis

TGA analyses were performed on a Setaram Setsys Evolution 16 apparatus, by heating the samples at a rate of 10 °C.min^{-1} from 20 to 600 °C under argon atmosphere.

3. Results and discussion

The present work focuses on the preparation of oligomers from different PHAs which mainly differ in the average length of their side chains. The main characteristics of native PHAs are listed in Table 1. The TGA curves of PHB, PHBHV, and PHOHHx only revealed a one-step degradation process with nearly identical maximum decomposition temperatures. However, the decomposition temperature determined for a 50% mass loss indicated that the degradation was more hindered as the length of the PHA side chain increased. Similar results were observed in the enzymatic degradation of PHAs [38].

3.1. PHA degradation under conventional heating

Many studies have shown that PHAs are thermally unstable at a temperature close to a higher than their melting point range, *i.e.* 180 °C for PHB, and a range of 70–180 °C for the PHA-based statistical copolymers [21,26,27]. According to TGA and DSC analyses (not shown here), a degradation implying a melt process was carried out at 190 °C for various reaction times, and the crude products were analyzed by ^{1}H NMR and SEC.

Table 1
Molecular and thermal characteristics of PHAs under investigation.

PHA	molar composition (mol-%)	M_n [a] (g.mol^{-1})	I_p [a]	T_g [b] (°C)	T_m [b] (°C)	ΔH_m [b] (J.g^{-1})	T_{d50} [c] (°C)
PHB	100 HB	144 000	2.3	8	176	72	267
PHBHV	88 HB/12 HV	84 000	2.4	−2	153	69	275
PHOHHx	85 HO/15 HHx	130 000	1.5	−40	53	27	286

[a] M_n : number-average molar mass as determined by SEC-RI ($CHCl_3$, polystyrene standards), I_p: polydispersity index.
[b] Glass transition temperature (T_g), melting temperature (T_m) and enthalpy as determined by DSC.
[c] T_{d50} : decomposition temperature Determined by TGA for a 50% mass loss.

Fig. 1 shows the typical ^{1}H NMR spectrum of the product resulting from the thermal degradation of PHBHV at 190 °C for 300 min Fig. 1 displays the signals characteristic of PHBHV (protons 2,2′) and the resonance bands assigned to the protons of the terminal crotonic double bond at 5.8 ppm (proton 5) and at 6.9 ppm (proton 6). For oligomers with molar masses lower than about 20 000 g.mol^{-1}, the M_n values could be calculated from ^{1}H NMR spectra (see Fig. 1 as an example) using the equations below:

$$P_n = \frac{I_{2,2'}}{I_{5or\ 6}}$$

$$M_n = P_n \times M_0$$

Where P_n represents the number-average degree of polymerization, I the intensity of a resonance signal, M_n the number-average molar mass, and M_0 the molar mass of the repeating unit.

As illustrated in Fig. 2, the thermal treatment produced a dramatic reduction in M_n as a function of time. The depolymerization proceeded rapidly in the early stage of the reaction, and then levelled off with prolonged times. PHB and PHBHV showed a faster degradation compared with that of PHOHHx. These results clearly indicated that the longer the side chain, the slower the thermal degradation. This was in agreement with previous studies [39–42] in which the thermal stability of PHB-based statistical copolymers increased with increasing the number of structural carbon units in the polymers. Similar results were observed in the case of PHA biodegradation by enzymatic action [43–45]. These results could be explained in terms of degree of crystallinity and hydrophobic feature: a higher crystallinity led to a faster degradation and a long side chain hindered the access of depolymerase.

As thermal degradation occurred at a constant temperature, the variation of the average number of bond cleavages per original polymer molecule ($N_{(t)}$) with the degradation time could be calculated according the following equation:

$$N_{(t)} = \frac{M_{n(0)}}{M_{n(t)}} - 1 = k_d\, P_{n(0)}\, t$$

where M_n represents the number-average molar mass, k_d the rate constant of the thermal degradation, and $P_{n(0)}$ the degree of polymerization at $t = 0$.

It has been demonstrated that the average number of bond cleavages per polymer chain ($N_{(t)}$) linearly increased with the degradation time, indicating that the M_n decrease was due to random chain scissions. This agreed with the proposed random mechanism associated with PHAs thermally degraded at temperatures between 170 and 200 °C [26,27,46,47]. k_d values were obtained from the slope of the linear $N_{(t)}$ vs. t plot (results not shown). The relationship $k_{d\ PHOHHx}$ (0.8 10^{-4} min^{-1}) < $k_{d\ PHBHV}$ (1.0 10^{-4} min^{-1}) < $k_{d\ PHB}$ (5.1 10^{-4} min^{-1}) summarized the comparison of the thermal degradation behaviour of the three PHAs under investigation.

As shown in Table 2, regardless of the degradation time, the polydispersity index (I_p) calculated from SEC data did not display any significant change. It did not vary drastically during thermal degradation, remaining close to 2.0 as the starting I_p value of native PHAs. The absence of significant variation associated with I_p values agreed with a random degradation mechanism as was previously observed by several authors [26,27,46,48] which have demonstrated the random chain scission on the basis of the aforementioned linear relation. PHAs oligomers were generally obtained with yields higher than 90% and varying molar masses depending on the degradation time. However, for an extended degradation time (300 min), a very low yield of 10% was obtained, indicating that a large amount of volatile low molar mass compounds was produced (*e.g.* crotonic acid). Therefore, the efficient preparation of low molar mass PHA oligomers, which could further be used in copolymer synthesis, seems to be a limitation of the degradation under conventional heating.

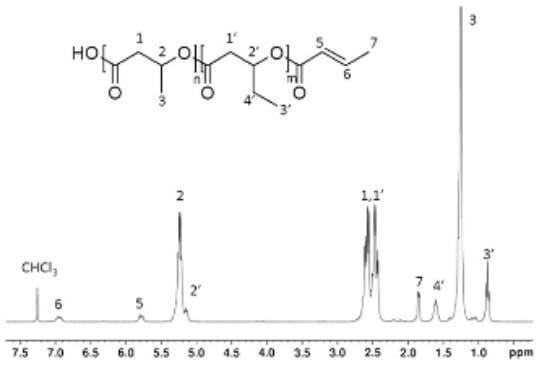


Fig. 1. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) spectrum of a PHBHV oligomer obtained by conventional thermally-induced degradation after 300 min at 190 °C.

Table 2
Molecular characteristics of PHA oligomers obtained by conventional thermally-induced degradation at 190 °C.

PHA	t (min)	Yield (%)	M_n [a] (g.mol^{-1})	M_n [b] (g.mol^{-1})	I_p [b]
PHB	0			144 000	2.3
	15	95	17 000	21 000	2.4
	75	92	1100	2400	2.4
PHBHV	0			84 000	2.4
	60	96	5400	11 000	1.9
	300	10	1000	3100	1.9
PHOHHx	0			130 000	1.5
	120	95	22 000	18 300	1.9

[a] M_n : number-average molar mass as determined by ^{1}H NMR measurement.
[b] M_n : number-average molar mass as determined by SEC-RI ($CHCl_3$, polystyrene standards), I_p :polydispersity index as calculated by SEC-RI.

3.2. Microwave-assisted PHA degradation

The same procedure as that used in the conventional heating study was applied using microwave irradiation to compare the impact of the latter treatment on PHA degradation. Microwave irradiation is known to produce an efficient internal heating by direct coupling of microwave energy with molecules [49,50]. The degradation study was carried out in a microwave reactor in which the power and temperature were controlled.

Two procedures were investigated: either an irradiation at constant temperature or an irradiation under constant power. In the first approach, the set temperature was monitored from the bottom of the glass tube using an external infrared temperature sensor and maintained at a selected value. The set temperature was reached as fast as possible (150 s) which involved a high initial power ($P \sim 300$ W), thus providing much energy to the reaction mixture. The second irradiation mode consisted in applying a constant level of microwave power while the vessel reaction could be cooled from outside by compressed air. This heating mode enabled the continuous application of a high level of microwave power while preventing the initial overheating.

The high efficiency of microwave irradiation in the first procedure, *i.e.* at constant temperature, is illustrated in Table 3. As expected, PHA degradation was favoured by an increase in temperature and reaction time. Nonetheless, it is noteworthy that the M_n of PHBHV dropped sharply from 84 000 to about 1000 within 1 s. When PHAs were degraded continuously after 1 s, the molar mass decreased slowly and eventually came to a standstill after short times (t gt; 60 s) (Fig. 3). Interestingly, yields were higher than those obtained under conventional heating, which might suggest that negligible amounts of crotonic acid were formed in comparison with a classical convection/conduction degradation. As a reminder under conventional heating, molar masses lower than 1000 g.mol^{-1} could generally be obtained with a yield lower than or equal to 10%. It is important to point out that the time of 1 s did not take into account the pre-heating period, which typically lasted around 150 s under the microwave conditions used. The results seemed to demonstrate that the degradation reaction occurred mainly during the latter preliminary stage implying a high power level to reach the set temperature. Similarly to the conventional heating (Fig. 2), the degradation of PHAs with short side-chain length was easier than that of PHAs with medium side-chain length, such as PHOHHx (Table 3 and Fig. 3). The ^{1}H NMR spectra of the oligomers obtained by MW-assisted degradation did not show any difference compared with those corresponding to the samples obtained by thermally-induced degradation (results not shown), which indicated that both sets of oligomers displayed identical chemical structures, in particular a terminal crotonic double bond and a carboxyl group on the other chain end.

Table 3
Molecular characteristics of PHA oligomers obtained by microwave-assisted degradation with different temperatures and times.

PHA	T(°C)	t(s)	Yield (%)	M_n [a] (g.mol^{-1})	M_n [b] (g.mol^{-1})	I_p [b]
PHBHV	180				84 000	2.4
		1	95	1350	1830	15.0
		30	89	1000	2050	10.0
		60	90	960	2000	8.5
		300	91	950	1200	7.6
		600	84	840	1200	5.0
	200	1	91	990	1880	12.0
		30	86	800	1800	4.8
		60	84	750	1500	4.1
		300	89	660	1400	3.4
		600	85	520	1020	2.1
	220	1	94	860	1360	3.6
		30	83	570	1550	3.0
		60	88	560	1550	2.9
		300	70	380	770	2.7
		600	60	310	980	1.7
PHOHHx	180				130 000	1.5
		1	100	7810	7650	10.0
		30	100	7380	7150	7.4
		60	100	7350	6700	4.6
		300	100	6830	6250	3.8
		600	100	6250	4760	3.8
	200	1	100	4525	4540	6.0
		30	100	3755	3310	5.1
		60	98	2450	3100	4.7
		300	98	2530	2300	5.2
		600	98	2520	1870	2.7
	220	1	96	1490	2230	4.5
		30	96	1360	2180	3.8
		60	95	1090	1950	2.9
		300	95	1090	1970	2.3
		600	90	810	1550	2.0

The set temperature T was reached as fast as possible and maintained at the selected value indicated in the table.
[a] M_n : number-average molar mass asdetermined by ^{1}H NMR measurement.
[b] M_n : number-average molar mass as determined by SEC-RI ($CHCl_3$, polystyrene standards), I_p : polydispersity index as determined by SEC-RI.

Assuming that the degradation under microwave irradiation followed a random scission mechanism as it was observed under conventional thermal heating, the variation of the average number of bond cleavages per original polymer molecule ($N_{(t)}$) was plotted as a function of the reaction time. Fig. 4 represents the variation of $[N_{(t)}\cdot([M_n]_0/[M_n]) - 1]$ *vs.* time for the degradation of PHBHV under microwave irradiation at different temperatures. The curves exhibited two stages: first, a short stage ($t < 60$ s) occurred during which PHBHV was rapidly depolymerised, then a second phase took place with a much slower degradation rate which could be assumed to be similar to that found previously in the conventional heating ($k_{d\ 190\ °C} = 1.0\ 10^{-4}$ min^{-1}). Indeed, k_d values obtained during this second stage varied as follows: $k_{d\ 180\ °C} = 2.5\ 10^{-5}$ min^{-1}, $k_{d\ 200\ °C} = 9.7\ 10^{-5}$ min^{-1}, and $k_{d\ 220\ °C} = 2.3\ 10^{-4}$ min^{-1}.

The rate acceleration observed during the first stage could be ascribed to the high energy in the reaction medium arising from the initial application of a high power to attain the set temperature selected. Microwave irradiation indeed produced high and efficient internal heating by direct coupling of microwave energy with polar

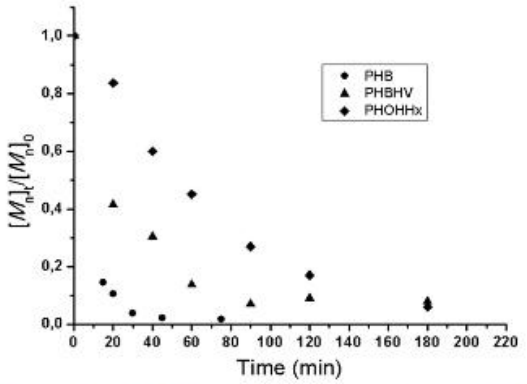


Fig. 2. Time dependence of $[M_n]_t/[M_n]_0$ for the conventional thermally-induced degradation of PHAs at 190 °C.

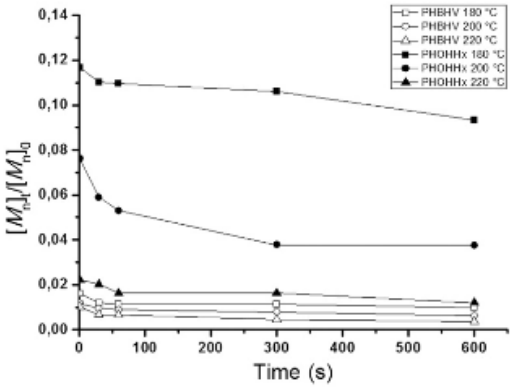


Fig. 3. Influence of temperature on the time dependence of $[M_n]_t/[M_n]_0$ for the microwave-assisted degradation of PHBHV and PHOHHx (irradiation at constant temperature, see experimental, section 2.2).

molecules, and it resulted in a strong polarization of polar bonds (such as the —COO— ester linkages) [50].

The use of a quartz reaction vessel that was microwave-transparent conducted to an inverted temperature gradient compared to conventional thermal heating: the bulk was heated first, and then the internal heating was transferred toward the outside reaction vessel [51]. However, it should be noticed that monitoring reaction temperatures by means of an external infrared sensor did not permit to get access to the true internal temperature; only the outside vessel wall could be accessed. Consequently, it can be assumed that the internal temperature was probably significantly higher than the temperature recorded by the IR sensor [51]. This high efficiency heating could well account for the rapid degradation in the first stage of the reaction. When the temperature of the outside reaction vessel reached the set temperature, the microwave power underwent small-scale oscillations. These low power values varied with the temperature, and they were equal to 25, 30, and 37 W at 180, 200, and 220 °C respectively. Accordingly, the whole set of results argued in favour of a bulk temperature effect responsible for the initial rate acceleration in microwave heating, and a non-thermal microwave effect could be precluded. This assertion corroborated the observations previously described

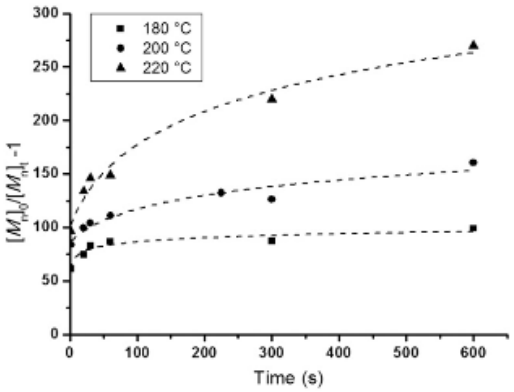


Fig. 4. Time dependence of $([M_n]_0/[M_n]_t$-1) at different constant temperatures for the degradation of PHBHV under microwave irradiation (see experimental, section 2.2).

and the conclusions drawn therefrom for several microwave-assisted reactions [49–51].

Furthermore, it is noteworthy that the samples derived from microwave irradiation exhibited polydispersity indices higher than those of the oligomers obtained from conventional thermal degradation. These results should be interpreted as the consequence of a macroscopic temperature effect and not as the outcome of a different degradation mechanism. The initial microwave power delivered to reach the set temperature could well have a significant impact on the melting of PHAs. For short degradation times and a temperature lower than 220 °C, we can suppose that the melting was not homogeneous within a PHA sample, considering the aforementioned bulk temperature effect. Consequently, the degradation might begin on the surface of the solid which was molten, and might move gradually into the rest of the solid (I_p gt; 10). It can also be assumed that the magnetic stirring was poorly efficient in the case of molten polymers, due to their high viscosity, thus leading to the occurrence of a temperature gradient within the samples. For temperatures lower than 200 °C and/or short times ($t < 10$ min), the molar mass distribution showed broad molar mass distributions. Nonetheless, the I_p values decreased significantly with the degradation time and the temperature (Table 3 and Fig. 5 as an example). The comparison of SEC curves at 1 s and 5 min for the 3 temperatures considered indeed showed that the molar mass distribution decreased with time, as expected, and became sharper with increasing temperature (Fig. 5). This might be explained by

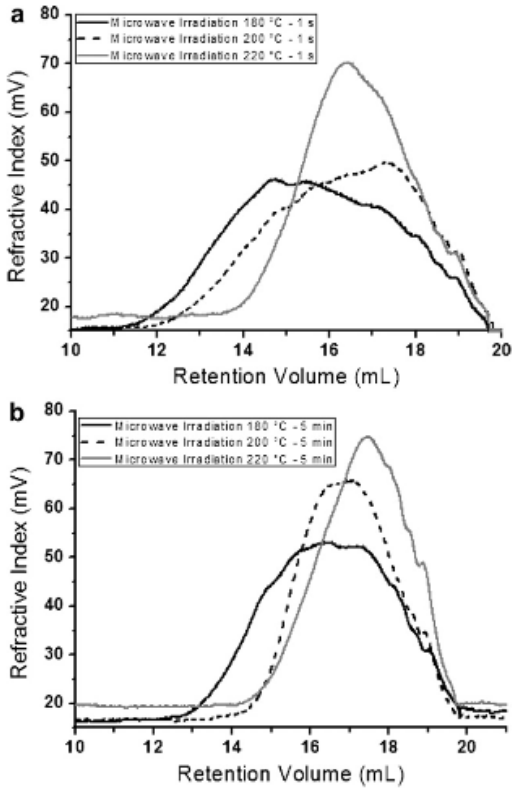


Fig. 5. SEC traces of solid residues obtained by degradation of PHBHV upon microwave irradiation at various constant temperatures (180 °C, 200 °C, 220 °C, see experimental, section 2.2): (a) 1 S of irradiation, (b) 5 min of irradiation.

Table 4
Molecular characteristics of PHBHV oligomers obtained by microwave-assisted degradation with different irradiation power values and times.

P (W)	Cooling[a]	t (s)	Yield (%)	M_n [b] (g.mol^{-1})	M_n [c] (g.mol^{-1})	I_p [c]
50	with	900	95	n.d.	32 200	4.1
60	with	900	93	n.d.	26 400	4.9
70	with	900	98	n.d.	18 800	5.7
80	with	900	90	n.d.	17 500	5.9
90	with	900	93	1750	3700	3.8
100	with	60	100	n.d.	84 000	2.4
	with	120	100	n.d.	84 000	2.4
	with	180	93	n.d.	84 000	2.4
	with	300	93	12 200	45 500	5.0
	with	450	91	4300	8500	18.0
	with	600	77	3000	3300	28.0
	with	900	73	1250	3200	22.0
100	without	60	100	n.d.	84 000	2.4
	without	120	100	n.d.	50 000	5.2
	without	180	80	5500	7350	16.0
	without	300	95	990	1900	4.7

n.d.: not determined (due to sensitivity of ^{1}H NMR).
[a] Irradiation mode applying a constant level of microwave power with ou without external cooling.
[b] M_n : number-average molar mass as determined by ^{1}H NMR measurement.
[c] M_n : number-average molar mass as determined by SEC-RI ($CHCl_3$, polystyrene standards), I_p : polydispersity index as calculated by SEC-RI.

a more homogeneous melting of PHAs, along with a less pronounced gradient temperature, at high temperatures and/or prolonged times. Moreover, for a degradation temperature of 180 °C, the use of low crystallinity degree PHA, such as PHOHHx, led to the generation of oligomers possessing a lower polydispersity because of an easier melting.

The second procedure investigated in the microwave-assisted PHBHV degradation was carried out at different constant power levels. In such reactions, the samples were submitted to irradiation pulses at constant power during various times, with or without cooling to prevent overheating. The constant power mode permits to deliver much energy to the reaction mixture, thus leading to the increase of its temperature. It is noteworthy that the melt of PHBHV could only be achieved for a power higher than or equal to 50 W. As shown in Table 4, the degradation of PHBHV proceeded less rapidly than in the first procedure, *i.e.* a microwave irradiation at constant temperature. The differences faded with prolonging the irradiation time, and the final M_n reached a similar value around 1000 g.mol^{-1} after 900 s under 100 W. In the latter case, the PHA degradation under microwave irradiation and cooling simultaneously led to the production of highly polydisperse oligomers. This could be explained by the occurrence of a large temperature gradient between different areas of the reaction mixture: it is plausible that those located near the microwave source and those in front of the cooling flow underwent the heating differently. We can thus suppose that the melting was not homogeneous within the sample and that the degradation might begin in distinct bulk areas, then might move gradually to the areas located in front of the compressed air arrival which were at a smaller temperature.

Without the cooling system, the molar masses decreased as fast as observed using the temperature constant mode leading to the production of small PHAs oligomers in high yields. The same phenomenon involving high polydispersity indices occurred (Table 4), due to a substantial heterogeneity within the reaction mixtures.

4. Conclusions

This contribution has demonstrated the efficiency and versatility of the degradation of PHAs upon microwave irradiation as an alternative and straightforward approach to produce oligomers with varying molar masses and high yields in times much shorter (about 100 times faster rate) than those typically used in the degradation under conventional thermal heating.

Suitable conditions using temperature-controlled microwave irradiation revealed that small oligomers ($M_n \leq 1000$ g.mol^{-1}) with high yields could be isolated at 200 °C or 220 °C within only 10 min. Modulating the level of microwave power with applying simultaneously cooling proved to be effective to control the rate of degradation. The reaction was somehow sensitive to prolonged reaction times, as the yield diminished gradually with longer reaction times or higher power (small oligomers were obtained within 15 min in the 70–90% yield range).

The whole set of results can be correlated to the very efficient heating using microwave irradiation that enables high internal reaction temperatures and ensures a fast complete melting of bulk PHAs. The true internal temperature was not known and was probably much higher than that recorded by means of an IR sensor. In this context, the initial acceleration observed in microwave heating could be explained by a bulk temperature effect (internal heating transferred from bulk toward outside reaction vessel) rather than a non-thermal microwave effect.

References

[1] Steinbuchel A, Valentin HE. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. FEMS Microbiol Lett 1995;128:219–28.
[2] Muller HE, Seebach D. Poly(hydroxyalkanoates): a Fifth class of Physiologically important organic biopolymers? Angew Chem Int Ed Engl 1993;23:477–502.
[3] Doi Y. Microbial polyesters. New York: VCH; 1990.
[4] Freier T, Kunze C, Nischan C, Kramer S, Sternberg K, Sass M, et al. In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patch based on poly(3-hydroxybutyrate). Biomaterials 2002;23:2649–57.
[5] Holland SJ, Yasin M, Tighe BJ. Polymers for biodegradable medical devices: VII. Hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers: degradation of copolymers and their blends with polysaccharides under *in vitro* physiological conditions. Biomaterials 1990;11:206–15.
[6] Steinbuchel A. Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. Macromol Biosci 2001;1:1–24.
[7] Witholt B, Kessler B. Perspectives of medium chain length poly(-hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. Curr Opin Biotechnol 1999;10:279–85.
[8] Doi Y, Abe C. Biosynthesis and characterization of a new bacterial copolyester of 3-hydroxyalkanoates and 3-hydroxy-omega.-chloroalkanoates. Macromolecules 1990;23:3705–7.
[9] Kim YB, Rhee YH, Han SH, Heo GS, Kim JS. Poly-3-hydroxyalkanoates produced from *Pseudomonas oleovorans* Grown with ω-Phenoxyalkanoates. Macromolecules 1996;29:3432–5.
[10] Lenz RW, Kim YB, Fuller RC. Production of unusual bacterial polyesters by Pseudomonas oleovorans through cometabolism. FEMS Microbiol Rev 1992;103:207–14.
[11] Fritzsche K, Lenz RW, Fuller RC. Bacterial polyesters containing branched poly(β-hydroxyalkanoate) units. Int J Biol Macromol 1990;12:92–101.
[12] Park WH, Lenz RW, Goodwin S. Epoxidation of bacterial polyesters with unsaturated side chains. I. Production and Epoxidation of polyesters from 10-Undecenoic acid. Macromolecules 1998;31:1480–6.
[13] Steinbuchel A. In: Byrom D, editor. Biomaterials: novel materials from Biological Sources. Stockton: New York; 1991. p. 123–213.
[14] Brandl H, Gross RA, Lenz RW, Fuller RC. Plastics from bacteria and for bacteria: poly(β-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. In: Fiechter, editor. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, vol. 41. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 1990. p. 77–93.
[15] Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiol Rev 1990;54:450–72.
[16] Holmes PA. Applications of PHB - a microbially produced biodegradable thermoplastic. Phys Technol 1985;16:32–6.
[17] Babinot J, Renard E, Langlois V. Controlled synthesis of well-defined poly(3-hydroxyalkanoate)s-based amphiphilic diblock copolymers using click chemistry. Macromol Chem Phys 2011;212:278–85.
[18] Ajioka M, Suizu H, Higuchi C, Kashima T. Aliphatic polyesters and their copolymers synthetized through direct condensation polymerization. Polym Degrad Stab 1998;59:137–43.
[19] Hiki S, Miyamoto M, Kimura Y. Synthesis and characterization of hydroxyl-terminated [RS]-poly(3-hydroxybutyrate) and its utilization to block copolymerization with L-lactide to obtain a biodegradable thermoplastic elastomer. Polymer 2000;41:7369–79.

[20] Andrade AP, Neuenschwander P, Hany R, Egli T, Witholt B, Li Z. Synthesis and characterization of novel copoly(ester-urethane) containing blocks of poly-(R)-3-hydroxybutyrate]. Macromolecules 2002;35:4946 50.
[21] Timbart L, Renard E, Tessier M, Langlois V. Monohydroxylated poly(3-hydroxyoctanoate) oligomers and its functionalized derivatives used as macroinitiators in the synthesis of degradable diblock copolyesters. Biomacromolecules 2007;8:1255 65.
[22] Renard E, Walls M, Guérin P, Langlois V. Hydrolytic degradation of blends of polyhydroxyalkanoates and functionalized polyhydoxyakanoates. Polym Degrad Stab 2004;85:779 87.
[23] Kopinke FD, Mackenzie K. Mechanistic aspects of the thermal degradation of poly(lactic acid) and poly(β-hydroxybutyric acid). J Anal Appl Pyrolysis 1997; 40-41:43 53.
[24] Aoyagi Y, Yamashita K, Doi Y. Thermal degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate], poly[ε-caprolactone] and poly[(S)-lactide]. Polym Degrad Stab 2002;76:53 9.
[25] Ariffin H, Nishida H, Shirai Y, Hassan MA. Determination of multiple thermal degradation mechanisms of poly(3-hydroxybutyrate). Polym Degrad Stab 2008;93:1433 9.
[26] Kopinke FD, Remmler M, Mackenzie K. Thermal decomposition of biodegradable polyesters I. Poly(β-hydroxybutyric acid). Polym Degrad Stab 1996; 52:25 38.
[27] Nguyen S, Yu G, Marchessault RH. Thermal degradation of poly(3-hydroxyalkanoates): preparation of well-defined oligomers. Biomacromolecules 2002;3:219 24.
[28] Abe H, Doi Y, Hori Y, Hagiwara T. Physical properties and enzymatic degradability of copolymers of (R)-3-hydroxybutyric acid and (S, S)-lactide. Polymer 1998;39:59 67.
[29] Gross RA, Mc Carthy SP, Reeve MS. US Patent 1995;5:439, 985.
[30] Hirt T, Neuenschwander P, Suter U. Telechelic diols from poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and poly[[(R)-3-hydroxybutyric acid]-co-[(R)-3-hydroxyvaleric acid]. Macromol Chem Phys 1996;197:1609 14.
[31] Andrade AP, Witholt B, Hany R, Egli T, Li Z. Preparation and characterization of Enantiomerically Pure telechelic diols from MCL-Poly-[(R)-3-Hydroxyalkanoates]. Macromolecules 2002;35:684 9.
[32] Khemani K, Scholz C, editors. ACS Symposium Series, vol. 939; 2006. Washington, DC.
[33] Sibata C. Industrial microwave power engineering. Denkishoin Publishers Co., Ltd; 1986.
[34] Neuchter M, Ondruschka B, Bonrath W, Gum A. Microwave assisted synthesis - a critical technology overview. Green Chem 2001;6:128 41.
[35] Ebner C, Bodner T, Stelzer F, Wiesbrock F. One decade of microwave-assisted polymerizations: quo vadis? Macromol Rapid Commun 2011;32:254 88.
[36] Bear MM, Leboucher-Durand MA, Langlois V, Lens RW, Goodwin S, Guerin P. Bacterial poly-3-hydroxyalkenoates with epoxy groups in the side chains. React Funct Polym 1997;34:65 77.
[37] Hartmann R, Hany R, Geiger T, Egli T, Witholt B, Zinn M. Tailored biosynthesis of olefinic medium-chain-length poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas putida* Gpo1 with improved thermal properties. Macromolecules 2004; 37:6780 5.
[38] Li Zhenguo, Lin Hao, Ishii Nariaki, Chen Guo-Qiang, Inoue Yoshio. Study of enzymatic degradation of microbial copolyesters consisting of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates. Polym Degrad Stab 2007;92:1708 14.
[39] Lee MY, Lee TS, Park WH. Macromol. Effects of side chains on the thermal degradation of poly(3-hydroxyalkanoates). Mcromol Chem Phys 2001;202:1257 61.
[40] He JD, Cheung MK, Yu PH, Chen GQ. Thermal analyses of poly(3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrateco-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). J Appl Polym Sci 2001;82:90 8.
[41] Li SD, He JD, Yu PH, Cheung MK. Thermal degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) as studied by TG, TG-FTIR, and Py-GC/MS. J Appl Polym Sci 2003;89:1530 6.
[42] Carrasco F, Dionisi D, Martinelli A, Majone M. Thermal stability of poly-hydroxyalkanoates. J Appl Polym Sci 2006;100:2111 21.
[43] Wang YW, Mo WK, Yao HL, Wu Q, Chen GQ. Biodegradation studies of poly(3-hydroxy butyrate-co-3-hydroxyhexanoate). Polym Degrad Stab 2004;85:815.
[44] Doi Y, Kitamura S, Abe H. Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). Macromolecules 1995;28: 4822 8.
[45] Doi Y, Kanesawa Y, Kunioka M. Biodegradation of microbial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). Macromolecules 1990;23:26 31.
[46] Grassie N, Murray E. The thermal degradation of poly(-(D)-β-hydroxybutyric acid): Part 2-Changes in molecular weight. Polym Degrad Stab 1984;6: 95 103.
[47] Grassie N, Murray E, Holmes PA. The thermal degradation of poly(-(D)-β-hydroxybutyric acid): Part 3 The reaction mechanism. Polym Degrad Stab 1984;6:127 34.
[48] Janigova I, Lacik I, Chodak I. Thermal degradation of plasticized poly(3-hydroxybutyrate) investigated by DSC. Polym Degrad Stab 1984;6:127 34.
[49] Kappe CO. Controlled microwave heating in modern organic synthesis. Angew Chem Int 2004;43:6250 84.
[50] Galema SA. Microwave chemistry. Chem Soc Rev 1997;26:233 8.
[51] Herrero MA, Kremsner JM, Kappe CO. Nonthermal microwave effects revisited: on the importance of internal temperature monitoring and agitation in microwave chemistry. J Org Chem 2008;73:36 47.

2.3.2. Etude de l'effet « non-thermique » du chauffage par micro-ondes

L'essor de la chimie moléculaire et macromoléculaire sous activation micro-ondes rapportant des temps de réaction plus courts et des taux de conversion plus élevés que lors de l'utilisation d'un chauffage conventionnel a conduit à une spéculation sur l'existence d'un effet « non-thermique » des micro-ondes. Cependant, divers travaux récemment publiés sur la mise en évidence et l'élucidation de cet effet spécifique, sont à l'origine de différents débats et controverses à ce sujet. A cet égard, pour comparer précisément les chauffages conventionnels et micro-ondes, il a été montré que la température de la solution doit être mesurée à l'aide d'une fibre optique placée directement dans le système où une agitation efficace est assurée.

Dans ce contexte, nous avons évalué la contribution potentielle des micro-ondes sur une polymérisation modèle telle que la polymérisation par ouverture de cycle du D,L-Lactide. Cette réaction semble toute indiquée pour étudier la réalité de cet effet « non-thermique » du fait de la nature polaire de son mécanisme qui tend à rendre ce type de réaction plus sensible aux irradiations diélectriques. D'autre part, le toluène a été utilisé comme solvant en raison de sa faible constante diélectrique (ε = 2,38) et donc de sa faible capacité à convertir l'énergie électromagnétique en chaleur, capacité qui pourrait masquer un hypothétique effet « non-thermique » des micro-ondes.

La polymérisation du D,L-lactide a été effectuée selon trois modes de chauffage différents : sous irradiation micro-onde à puissance constante et refroidissement simultané pour stabiliser la température, sous micro-ondes à température constante impliquant une forte irradiation en début de réaction puis un maintien de la puissance à de faibles niveaux et enfin, par chauffage conventionnel en bain d'huile. Pour chaque mode utilisé, à température et temps de réaction équivalents, les polyesters synthétisés présentent des structures ainsi que des caractéristiques (M_n, I_p) tout à fait similaires. De plus, les cinétiques de polymérisation réalisées à 120, 130, 140 °C ont permis de calculer des énergies d'activation du même ordre de grandeur comprises entre 66,2 et 70,7 kJ.mol^{-1}.

Cette étude a montré qu'en présence d'un contrôle rigoureux de la température de la solution et d'une agitation efficace, aucune altération de la cinétique ou du caractère contrôlé de la polymérisation n'a pu être observé, démontrant ainsi l'absence d'un effet spécifique des micro-ondes sur les réactions impliquant ce type de mécanisme.

ARTICLE n°3

Macromolecular Chemistry and Physics

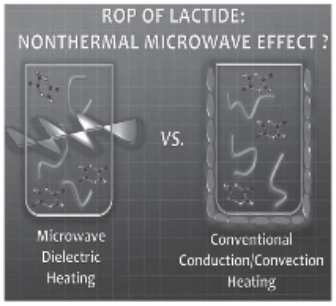
Macromolecular Journals

Full Paper

Microwave-Assisted Ring-Opening Polymerization of D,L-Lactide: A Probe for the Nonexistence of Nonthermal Microwave Effects

Julien Ramier, Estelle Renard, Daniel Grande*

Ring-opening polymerization of D,L-lactide is critically reevaluated under both microwave dielectric heating and conventional conduction/convection heating in order to probe the nonexistence of "nonthermal" microwave effects. All experiments are conducted in toluene by resorting to a fiber-optic sensor that allows for accurate internal reaction temperature measurements. For a given temperature, the results obtained either with a "temperature control" microwave heating mode or with a "power control" procedure can well be reproduced through conventional thermal heating. Microwave irradiation does not induce any alteration of the polymerization kinetics or "livingness", clearly demonstrating the absence of any specific "nonthermal" effect in the microwave-assisted process.



1. Introduction

Since the first microwave-assisted organic syntheses in the mid 1980s,[1] interest in microwave irradiation as a highly efficient and versatile heating technique has considerably grown in the field of chemistry. Interestingly, microwave irradiation is known to be characterized by a heating efficiency and homogeneity higher than those encountered in conventional conduction/convection heating.[2,3] However, recent studies on the greenness of microwave chemistry have demonstrated that it can only be considered as an environmentally friendly procedure with a reduced energy consumption using multimode microwave reactors, which are more efficient at transferring microwave energy to larger scale reactions. In fact, comparing a mole-for-mole basis, a high energy monomode microwave reactor requires little energy to heat small-scale tubes whereas a conventional oil bath can heat larger vessels or multiple tubes simultaneously.[4] Furthermore, interest in microwave heating procedures not only originates from their potentially low environmental impact but also from the reaction rate enhancement, which is often connected with the use of pressurized reactors permitting to attain high reaction temperatures.[2,3]

Over the last decade, microwave-assisted procedures have largely been applied to (co)polymer synthesis through a wide variety of mechanisms,[3,5] including step-growth polymerization (for the preparation of polyamides,[6] polyimides,[7] or poly(lactic acid)[8]), classical free-radical polymerization,[9] and controlled free-radical polymerization.[10] Cationic ring-opening polymerization (ROP) has thoroughly been investigated by Schubert and co-workers with the (co)polymerization of various 2-oxazoline monomers,[11] and it has been shown that the observed rate acceleration is apparently due to purely thermal effects.[12] Moreover, the bulk ROP of D,L-lactide has also been carried out using different levels of irradiation power, thus leading to a fast polymerization process and the formation of high molar mass polymers.[13]

J. Ramier, Prof. E. Renard, Dr. D. Grande
"Complex Polymer Systems" Laboratory, Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est, UMR 7182 CNRS-Université Paris-Est Créteil, 2, rue Henri Dunant, 94320 Thiais, France
E-mail: grande@icmpe.cnrs.fr

Macromol. Chem. Phys. 2012, 213, 784–788
© 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

DOI: 10.1002/macp.201200008

The higher yields and shorter reaction times compared with conventional heating procedures have led to a speculation on the occurrence of "nonthermal" microwave effects in microwave-assisted reactions.[14,15] Such effects have been postulated to arise from a direct stabilizing interaction of the electromagnetic field with polar molecules in reaction media that is not related to a macroscopic thermal effect. Much attention has been paid to the elucidation of these so-called "specific" microwave effects in organic syntheses, and they have been the subject of considerable debate and controversy.[16,17] In order to determine whether these specific effects truly occur during microwave irradiation, the bulk temperatures need to be known accurately to compare them with those measured in conventional heating. Kappe and co-workers have developed a suitable way to monitor the internal temperatures of reaction solutions, which consists in placing a fiber-optic probe directly inside the reaction vessel to get access to the exact temperatures with a low response time, provided an efficient stirring is ensured.[18]

Despite the remarkable rise of the number of papers published on microwave-assisted polymer synthesis over the last decade, the potential contribution of "nonthermal" microwave effects in polymerization processes involving polar reactions has not clearly been evidenced and separated from the thermal effects so far. Yet, the absence of specific enhancement of the polymerization rate using microwave activation has already been reported for free-radical polymerization processes.[19,20] In this context, we herein implement a critical investigation to distinguish whether the microwave dielectric heating specifically influences the ROP of D,L-lactide as a model polymerization reaction by using a fiber-optic sensor immersed in toluene solutions under vigorous stirring. In one such hypothesis, the pre-exponential factor in the Arrhenius equation would be increased while the activation energy would be lowered compared with the values corresponding to the reaction conducted under conventional thermal heating.

2. Experimental Section

2.1. Materials

3,6-dimethyl-1,4-dioxane-2,5-dione (D,L-lactide, LA), anhydrous benzyl alcohol (99.8%, BzOH), tin (II) 2-ethylhexanoate (95%, $SnOct_2$), and anhydrous toluene (99.8%) were purchased from Sigma-Aldrich, while petroleum ether was purchased from Carlo-Erba.

2.2. Ring-Opening Polymerization of D,L-Lactide Upon Microwave Irradiation and Conventional Heating

The microwave-assisted ROP of LA was carried out using an Anton-Paar monomode 300 microwave reactor. The microwave source was a magnetron with a 2.45 GHz frequency powered by a 900 W power generator, which could be operated at different power levels. Typically, 750 mg (5.2×10^{-3} mol) of LA were dissolved in 3 mL of anhydrous toluene in a 10 mL microwave-transparent quartz vial, and freeze-dried overnight. Then, 4 mL of anhydrous toluene, 0.5 mol% (8 µL) of $SnOct_2$ and 5.6 mg (5.2×10^{-5} mol) of benzyl alcohol ($[LA]_0/[BzOH]_0$ molar ratio equal to 100/1) were added under a dried argon flow, and the vial was closed with a silicon cap. The internal reaction temperature was monitored and controlled with a fiber-optic sensor (Ruby thermometer) immersed in the reaction solution under vigorous stirring. The polymerization was terminated by cooling the vial with compressed air. The as-polymerized product was precipitated three times in a 10-fold excess of petroleum ether, filtered, and dried under vacuum at 50 °C.

In the case of conventional thermal heating, the polymerization was carried out using a pre-heated oil bath. The temperature was controlled with a classical thermometer immersed into the reaction solution. The polymerization was terminated by cooling the vial in a water bath, and the polymer was recovered as described above.

2.3. Heating Modes for Microwave-Assisted Procedures

The microwave-assisted ROP of LA was performed using two different heating procedures: either the "power control" (PC) mode or the "temperature control" (TC) one. The TC mode consisted in reaching the set temperature as fast as possible, which involved the application of a high initial microwave power and then the temperature was maintained at the selected value with a low irradiation power during the reaction time. The PC mode corresponded to the continuous application of a high level of microwave power (140, 90, and 60 W at 140, 130, and 120 °C, respectively) while the reaction vessel was simultaneously cooled by compressed air in order to maintain a set temperature and remove the overheating.[21] In such a heating mode, a constant level of irradiation power could be applied during the reaction time, thus preventing overheating and potentially revealing nonthermal microwave effects.

2.4. Instrumentation

^1H spectra were recorded at room temperature on a Bruker 400 MHz NMR spectrometer. Deuterated acetone was used as the solvent and the internal standard (2.05 ppm).

SEC experiments were performed at room temperature using a Spectra Physics P100 pump and two PL-gel columns (5 µm Mixed-C) connected in series from Polymer Laboratories. A Wyatt Technology Optilab rEX interferometric refractometer was used as the detector. THF was used as the eluent at a flow rate of 1 mL min^{-1}, and polystyrene standards were employed for calibration.

3. Results and Discussion

Noticeably, microwave irradiation is considered to conduct to an inverted temperature gradient compared with conventional thermal heating: first the bulk is heated

© 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

homogeneously provided an efficient stirring is ensured and then the internal heating is transferred toward the outside reaction vessel.[16,17] Consequently, it can assumed that the internal temperatures are probably significantly higher than the external ones. Kappe and co-workers have demonstrated that the use of an external infrared sensor is not an acceptable way to monitor the true internal temperatures — especially when a simultaneous cooling is used — since the outside vessel temperatures can only be recorded, thus leading to a lag between the real internal temperatures and the measured external ones, and a misinterpretation of the results.[18] In contrast, a means to measure accurately the internal temperatures of reaction solutions has used a fiber-optic probe device directly inside the reaction vessel.[18] Nevertheless, as far as solvent-free reactions are concerned, it should be stressed that no value of the real bulk temperature has hitherto been reported mainly because of the technical difficulty in setting up a device that allows for precise internal temperature measurements.

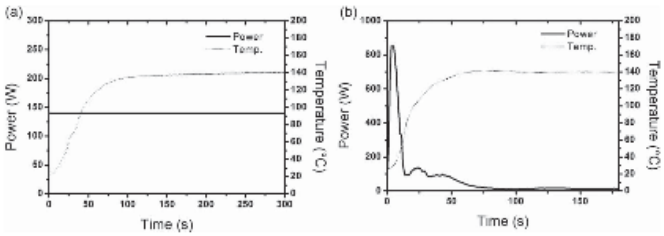


Figure 1. Typical power and temperature profiles during microwave irradiation using (a) the "power control" mode (set power: 140 W, set temperature: 140 °C) and (b) the "temperature control" mode (set temperature: 140 °C).

To circumvent this limitation and get a clear insight into the contributions of thermal and "nonthermal" microwave effects in microwave-assisted polymerizations, we reevaluated the ROP of LA as a model reaction in toluene. This standard organic solvent was selected because of its low microwave absorbing character characterized by a very weak dielectric loss factor ($\tan\delta = 0.04$ at room temperature),[22] thus leading to a poor ability to convert electromagnetic energy into heat. In other words, the solvent could not absorb the microwave energy, and therefore did not mask potential specific microwave effects.[16,17] According to Perreux and Loupy,[23] polar reaction pathways are more sensitive to microwave irradiation and are likely to undergo a "nonthermal" microwave effect due to a potential stabilization of the polar transition state by the electromagnetic field resulting from better material–wave interactions during the reaction. Therefore, the ROP of LA seems to be appropriate to probe the existence of microwave effects due to its polar mechanism via coordination-insertion. The first step entails the complexation between the catalyst ($SnOct_2$) and the alcohol initiating function (benzyl alcohol) and leads to the formation of a nucleophilic complex that attacks the polarized carbonyl group of the lactone monomer.[24] In addition, not only might the microwave irradiation have a noticeable impact on the polymerization kinetics but also it might also influence the "livingness" of the process.

It is important to point out that the kinetics associated with the ROP of LA initiated by benzyl alcohol and catalyzed by $SnOct_2$ was investigated under conventional heating (CH) using a pre-heated oil bath and under microwave irradiation through two different heating modes (PC and TC, Figure 1). In addition, pressure resistant quartz vials were used in order to work above the toluene boiling point (bp 111 °C). As shown in Table 1, after 1 and 2 h of reaction at 140 °C, the conversion rates were nearly identical and reached respectively about 53% and 73% for the three procedures considered. The differences observed in the monomer conversion for 30 min of reaction could be commented further. Indeed, a lower conversion obtained by the CH procedure could be explained by a larger induction period necessary to reach 140 °C in the latter case. In contrast, the TC mode involved the initial application of a very high microwave power thus allowing for a fast dielectric heating to attain the set temperature (Figure 1b), which could well account for the higher conversion obtained. Table 1 also illustrates that the polydispersity index (PDI) values remained constant at 1.3 throughout the polymerization process whatever be the heating procedure. Therefore, microwave irradiation did not induce any specific effect on the molar mass distributions compared with conduction/convection heating.

A more thorough kinetic investigation was performed for the three heating procedures at 120, 130, and 140 °C (Figure 2). The simultaneous linear variations of $Ln([M]_0/[M])$ versus time (Figure 2a) and $\overline{M}_n$ versus monomer conversion (Figure 2b) gave evidence of the "living"/controlled character associated with the mechanism of ROP of LA under the different conditions selected. It should be mentioned that LA conversion was determined gravimetrically, while molar mass values were calculated by ^1H NMR. As expected, the chain-growth kinetics depended on the temperature, and the polymerization rate constants (k_p) — determined from the slopes of the first-order kinetic plots — at 140 °C were significantly higher than those determined at 120 °C (Table 2). More interestingly, the kinetic plots associated with each temperature, so in turn the k_p values, were nearly identical — within the experimental errors — for the three heating procedures, which indicated the absence of any acceleration in the microwave-assisted polymerization modes. Again, no

© 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Table 1. Comparison of conversions, molar masses, and polydispersity indices for the ROP of LA performed at 140 °C under microwave irradiation ("power control" mode (PC) and "temperature control" mode (TC)) and conventional heating (CH).

Time [s]	Heating Mode	p[a)] [%]	$\overline{M}_{n,theo}$[b)] [g mol^{-1}]	$\overline{M}_{n,NMR}$[c)] [g mol^{-1}]	$\overline{M}_{n,SEC}$[d)] [g mol^{-1}]	PDI[d)]
1800	PC	31	4500	5400	4200	1.3
	TC	33	4800	6100	4600	1.3
	CH	28	4000	5100	3800	1.3
3600	PC	53	7600	9100	5800	1.3
	TC	53	7600	9000	6100	1.3
	CH	52	7500	9000	6300	1.3
7200	PC	72	10 400	11 100	7500	1.3
	TC	73	10 500	11 400	7300	1.3
	CH	72	10 400	11 200	7900	1.3

[a)]LA conversion as determined by gravimetry; [b)]Theoretical molar mass calculated as follows: $\overline{M}_{n,theo} = M_{initiator} + [LA]_0/[BzOH]_0 \cdot M_{LA} \cdot p$; [c)]Experimental molar mass as determined by ^{1}H NMR; [d)]Experimental value as determined by SEC-RI (THF, polystyrene standards).

specific microwave effect could thus be evidenced from the polymerization kinetics.

The Arrhenius plots were deduced from the k_p values for the different temperatures (Figure 2c). As it could be anticipated from the aforementioned results, no significant alteration of the Lnk_p versus $1/T$ plots was noticed depending on the heating procedure. From their slopes, the activation energy (E_A) values could be determined: they were similar for the three heating procedures (66.9 ± 6.6, 66.2 ± 4.7, and 70.7 ± 4.7 kJ mol^{-1} for the PC mode, the TC mode, and the CH procedure, respectively). Moreover, from the intercepts with the Lnk_p axis, the pre-exponential factor (A) values could also be calculated: no significant differences were again observed for the three heating procedures (3.8 ± 2.9 × 10^6, 3.3 ± 2.5 × 10^6, 8.6 ± 5.1 × 10^6 L mol^{-1} s^{-1} for the PC mode, the TC mode, and the CH procedure, respectively). The whole set of results clearly demonstrated the absence of "nonthermal" microwave effects in the microwave-assisted ROP of LA, thus leading to the conclusion that only thermal effects are responsible for the polymerization process when applying either the "power control" heating mode or the "temperature control" procedure, as in the case of a conventional conduction/convection heating.

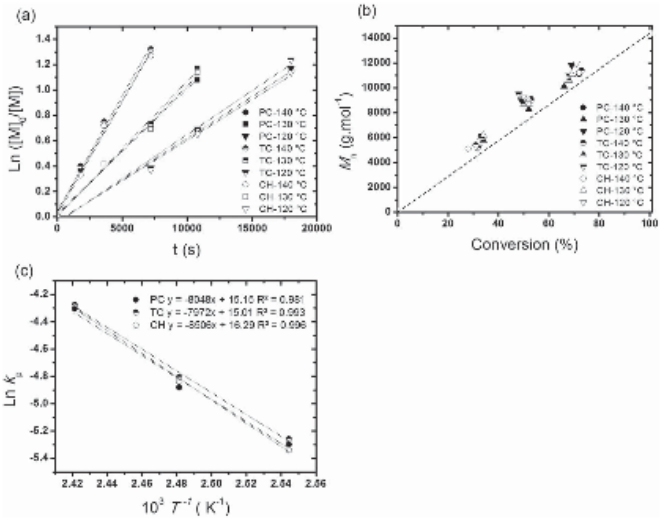


Figure 2. ROP of LA under microwave irradiation ("power control" mode (PC) and "temperature control" mode (TC)) and conventional heating (CH): (a) Kinetic plots of Ln([M]$_0$/[M]) versus reaction time at various temperatures; (b) Dependence of molar mass ($\overline{M}_n$) on monomer conversion (the dashed line corresponds to the theoretical variation of $\overline{M}_n$ with conversion); (c) Arrhenius plots (Lnk_p versus $1/T$).

4. Conclusion

The concept of "nonthermal" microwave effects has recently received much attention and has been the subject of intense debate and controversy in the scientific community. Although widely investigated in microwave-assisted organic reactions, these specific effects have not been closely studied in polymerization processes. This communication has aimed at fulfilling one such scarcity through the critical reevaluation of the ROP of D,L-lactide under both microwave dielectric

© 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Table 2. Polymerization rate constants (k_p) for the ROP of LA under microwave irradiation ("power control" mode (PC) and "temperature control" mode (TC)) and conventional heating.

Heating mode	120 °C	130 °C	140 °C
	$10^2 . k_p$ [L mol^{-1} s^{-1}]	$10^2 . k_p$ [L mol^{-1} s^{-1}]	$10^2 . k_p$ [L mol^{-1} s^{-1}]
PC	0.50 ± 0.01	0.76 ± 0.03	1.35 ± 0.08
TC	0.52 ± 0.02	0.82 ± 0.03	1.39 ± 0.08
CH	0.49 ± 0.01	0.79 ± 0.04	1.37 ± 0.07

heating and conventional thermal heating. It is important to point out that a low microwave absorbing solvent was selected (i.e. toluene) and a fiber-optic probe was used to accurately measure the internal reaction temperatures in order to monitor and compare effectively the heating procedures under investigation. For a given temperature, the results obtained either with the "temperature control" heating mode or with the "power control" procedure could well be reproduced through conventional thermal heating. Therefore, microwave irradiation did not induce any alteration of the polymerization kinetics or "livingness", clearly demonstrating the absence of any specific "nonthermal" effect in the microwave-assisted process.

The conclusion inferred from our detailed investigation agrees with those previously reported by Schubert's group for the cationic ROP of 2-oxazoline monomers and Kappe's group for several organic reactions. The rate enhancements often observed in microwave-assisted polymerization processes may stem from significant inaccuracies in temperature determination and a possible misinterpretation of the results due to an inappropriate device to measure internal reaction temperatures (i.e. external infrared sensor) and/or an inefficient stirring. Accordingly, we believe that these rate accelerations are a consequence of the increased temperatures attainable by the rapid, efficient, and homogeneous dielectric heating and are not related to "nonthermal" microwave effects due to the presence of the electromagnetic field.

Acknowledgements: The authors thank the French Ministry of Research for providing Julien Ramier with a grant. They are also indebted to Dr. F. Henry (CNRS, Thiais, France) for helpful discussions on microwave irradiation processes.

Received: January 10, 2012; Published online: March 5, 2012; DOI: 10.1002/macp.201200008

Keywords: activation energy; D,L-lactide; microwave irradiation; ring-opening polymerization; thermal effects

[1] a) R. J. Giguere, T. L. Bray, S. M. Duncan, G. Majetich, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4945; b) R. Gedye, F. Smith, K. Westaway, H. Ali, L. Baldisera, L. Laberge, J. Rousell, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 279.
[2] R. Nagahata, D. Sano, H. Suzuki, K. Takeuchi, *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, *28*, 437.
[3] A. Sosnik, G. Gotelli, G. A. Abraham, *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36*, 1050.
[4] a) J. D. Moseley, C. O. Kappe, *Green Chem.* **2011**, *13*, 794; b) R. Hoogenboom, T. F. A. Wilms, T. Erdmenger, U. S. Schubert, *Aust. J. Chem.* **2009**, *62*, 236.
[5] a) R. Hoogenboom, U. S. Schubert, *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, *28*, 368; b) C. Ebner, T. Bodner, F. Stelzer, F. Wiesbrock, *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 254.
[6] A. A. Caouthar, A. Loupy, M. Bortolussi, J.-C. Blais, L. Dubreucq, A. Meddour, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2005**, *43*, 6480.
[7] H. Yeganeh, B. Tamami, I. Ghazi, *Eur. Polym. J.* **2004**, *40*, 2059.
[8] S. Keki, I. Bodnár, J. Borda, G. Deák, M. Zsuga, *Macromol. Rapid Commun.* **2001**, *22*, 1063.
[9] a) M. Iannelli, H. Ritter, *Macromol. Chem. Phys.* **2005**, *206*, 349; b) M. Iannelli, V. Alupei, H. Ritter, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 1509.
[10] a) J. Rigolini, B. Grassl, L. Billon, S. Reynaud, O. F. X. Donard, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2009**, *47*, 6919; b) J. Rigolini, B. Grassl, S. Reynaud, L. Billon, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2010**, *48*, 5775.
[11] a) F. Wiesbrock, R. Hoogenboom, C. H. Abeln, U. S. Schubert, *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, *25*, 1895; b) F. Wiesbrock, R. Hoogenboom, M. A. M. Leenen, M. A. R. Meier, U. S. Schubert, *Macromolecules* **2005**, *38*, 5025.
[12] R. Hoogenboom, M. A. M. Leenen, F. Wiesbrock, U. S. Schubert, *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, *26*, 1773.
[13] C. Zhang, L. J. Liu, L. Q. Liao, *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, *25*, 1402.
[14] C. O. Kappe, A. Stadler, *Microwave in Organic and Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany **2005**, Ch. 2, p. 9.
[15] L. Perreux, A. Loupy, *Microwaves in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany **2006**, Ch. 4, p.134.
[16] a) C. O. Kappe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6250; b) D. Obermayer, B. Gutmann, C. O. Kappe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8321.
[17] B. A Roberts, C. R. Strauss, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 653.
[18] a) J. M. Kremsner, C. O. Kappe, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4651; b) M. Hosseini, N. Stiasni, V. Barbieri, C. O. Kappe, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 1417; c) M. A. Herrero, J. M. Kremsner, C. O. Kappe, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 36.
[19] H. Zhang, U. S. Schubert, *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, *25*, 1225.
[20] H. Stange, M. Ishaque, N. Niessner, M. Pepers, A. Greiner. *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27*, 156.
[21] WO 04002617 (2004), B. L. Hayes, M. J. Collins.
[22] B. L. Hayes, *Microwave Synthesis: Chemistry at the Speed of Light*, CEM Publishing, Matthews, NC **2002**.
[23] L. Perreux, A. Loupy, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9199.
[24] H. R. Kricheldorf, I. Kreiser-Saunders, C. Boettcher, *Polymer* **1995**, *36*, 1253.

© 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

2.4. Références bibliographiques

1. Preusting, H.; Nijenhuis, A.; Witholt, B., Physical characteristics of poly(3-hydroxyalkanoates) and poly(3-hydroxyalkenoates) produced by Pseudomonas oleovorans grown on aliphatic hydrocarbons. *Macromolecules* **1990,** 23, 4220-4224.
2. Lee, M. Y.; Park, W. H.; Lenz, R. W., Hydrophilic bacterial polyesters modified with pendant hydroxyl groups. *Polymer* **2000,** 41, 1703-1709.
3. Renard, E.; Poux, A.; Timbart, L.; Langlois, V.; Guerin, P., Preparation of a novel artificial bacterial polyester modified with pendant hydroxyl groups. *Biomacromolecules* **2005,** 6, 891-896.
4. Bear, M. M.; LeboucherDurand, M. A.; Langlois, V.; Lenz, R. W.; Goodwin, S.; Guerin, P., Bacterial poly-3-hydroxyalkenoates with epoxy groups in the side chains. *React. Funct. Polym.* **1997,** 34, 65-77.
5. Sparks, J.; Scholz, C., Synthesis and characterization of a cationic poly(beta-hydroxyalkanoate). *Biomacromolecules* **2008,** 9, 2091-2096.
6. Lee, M. Y.; Park, W. H., Preparation of bacterial copolyesters with improved hydrophilicity by carboxylation. *Macromol. Chem. Phys.* **2000,** 201, 2771-2774.
7. Kurth, N.; Renard, E.; Brachet, F.; Robic, D.; Guerin, P.; Bourbouze, R., Poly(3-hydroxyoctanoate) containing pendant carboxylic groups for the preparation of nanoparticles aimed at drug transport and release. *Polymer* **2002,** 43, 1095-1101.
8. Stigers, D. J.; Tew, G. N., Poly(3-hydroxyalkanoate)s functionalized with carboxylic acid groups in the side chain. *Biomacromolecules* **2003,** 4, 193-195.
9. Nguyen, S.; Yu, G. E.; Marchessault, R. H., Thermal degradation of poly(3-hydroxyalkanoates): Preparation of well-defined oligomers. *Biomacromolecules* **2002,** 3, 219-224.
10. Lemechko, P.; Renard, E.; Volet, G.; Colin, C. S.; Guezennec, J.; Langlois, V., Functionalized oligoesters from poly(3-hydroxyalkanoate)s containing reactive end group for click chemistry: Application to novel copolymer synthesis with poly(2-methyl-2-oxazoline). *React. Funct. Polym.* **2012,** 72, 160-167.
11. Ravenelle, F.; Marchessault, R. H., One-step synthesis of amphiphilic diblock copolymers from bacterial poly(R -3-hydroxybutyric acid). *Biomacromolecules* **2002,** 3, 1057-1064.
12. Lauzier, C.; Revol, J. F.; Debzi, E. M.; Marchessault, R. H., Hydrolytic Degradation of Isolated Poly(β-hydroxybutyrate) Granules. *Polymer* **1994,** 35, 4156-4162.
13. Timbart, L.; Renard, E.; Langlois, V.; Guerin, P., Novel biodegradable copolyesters containing blocks of poly(3-hydroxyoctanoate) and poly (epsilon-caprolactone): Synthesis and characterization. *Macromol. Biosci.* **2004,** 4, 1014-1020.
14. Lemechko, P.; Renard, E.; Guezennec, J.; Simon-Colin, C.; Langlois, V., Synthesis of dextran-graft-PHBHV amphiphilic copolymer using click chemistry approach. *React. Funct. Polym.* **2012,** 72, 487-494.
15. Babinot, J.; Renard, E.; Langlois, V., Controlled Synthesis of Well Defined Poly(3-hydroxyalkanoate)s-based Amphiphilic Diblock Copolymers Using Click Chemistry. *Macromol. Chem. Phys.* **2011,** 212, 278-285.
16. Babinot, J.; Guigner, J. M.; Renard, E.; Langlois, V., A micellization study of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoate)-based amphiphilic diblock copolymers. *J. Colloid Interface Sci.* **2012,** 375, 88-93.
17. Babinot, J.; Guigner, J. M.; Renard, E.; Langlois, V., Poly(3-hydroxyalkanoate)-derived amphiphilic graft copolymers for the design of polymersomes. *Chem. Commun.* **2012,** 48, 5364-5366.
18. Lao, H. K.; Renard, E.; Linossier, I.; Langlois, V.; Vallee-Rehel, K., Modification of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) film by chemical graft copolymerization. *Biomacromolecules* **2007,** 8, 416-423.
19. Lao, H. K.; Renard, E.; El Fagui, A.; Langlois, V.; Vallee-Rehel, K.; Linossier, I., Functionalization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Films via Surface-Initiated Atom Transfer Radical

Polymerization: Comparison with the Conventional Free-Radical Grafting Procedure. *J. Appl. Polym. Sci.* **2011,** 120, 184-194.
20. Lao, H. K.; Renard, E.; Langlois, V.; Vallee-Rehel, K.; Linossier, I., Surface Functionalization of PHBV by HEMA Grafting via UV Treatment: Comparison with Thermal Free Radical Polymerization. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010,** 116, 288-297.
21. Versace, D. L.; Dubot, P.; Cenedese, P.; Lalevee, J.; Soppera, O.; Malval, J. P.; Renard, E.; Langlois, V., Natural biopolymer surface of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-photoinduced modification with triarylsulfonium salts. *Green Chem.* **2012,** 14, 788-798.
22. Kempe, K.; Becer, C. R.; Schubert, U. S., Microwave-Assisted Polymerizations: Recent Status and Future Perspectives. *Macromolecules* **2011,** 44, 5825-5842.
23. Sosnik, A.; Gotelli, G.; Abraham, G. A., Microwave-assisted polymer synthesis (MAPS) as a tool in biomaterials science: How new and how powerful. *Prog. Polym. Sci.* **2011,** 36, 1050-1078.
24. Stange, H.; Ishaque, M.; Niessner, N.; Pepers, M.; Greiner, A., Microwave-Assisted Free Radical Polymerizations and Copolymerizations of Styrene and Methyl Methacrylate. *Macromol. Rapid Commun.* **2006,** 27, 156-161.
25. Rigolini, J.; Grassl, B.; Billon, L.; Reynaud, S.; Donard, O. F. X., Microwave-assisted nitroxide-mediated radical polymerization of acrylamide in aqueous solution. *Polym. Sci., Part A : Polym. Chem.* **2009,** 47, 6919-6931.
26. Liao, L. Q.; Liu, L. J.; Zhang, C.; He, F.; Zhuo, R. X.; Wan, K., Microwave-assisted ring-opening polymerization of ϵ-caprolactone. . *Polym. Sci., Part A : Polym. Chem.* **2002,** 40, 1749-1755.
27. Hoogenboom, R.; Paulus, R. M.; Pilotti, Å.; Schubert, U. S., Scale-up of Microwave-Assisted Polymerizations in Batch Mode: The Cationic Ring-Opening Polymerization of 2-Ethyl-2-oxazoline. *Macromol. Rapid Commun.* **2006,** 27, 1556-1560.
28. Kerep, P.; Ritter, H., Influence of Microwave Irradiation on the Lipase-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of ε-Caprolactone. *Macromol. Rapid Commun.* **2006,** 27, 707-710.
29. Zhang, C.; Liao, L.; Gong, S., Microwave-Assisted Synthesis of PLLA-PEG-PLLA Triblock Copolymers. *Macromol. Rapid Commun.* **2007,** 28, 422-427.
30. Fang, X.; Simone, C. D.; Vaccaro, E.; Huang, S. J.; Scola, D. A., Ring-opening polymerization of ϵ-caprolactam and ϵ-caprolactone via microwave irradiation. *J. Polym. Sci., Part A : Polym. Chem.* **2002,** 40, 2264-2275.
31. Timbart, L.; Renard, E.; Langlois, V.; Guerin, P., Novel biodegradable copolyesters containing blocks of poly(3-hydroxyoctanoate) and poly (epsilon-caprolactone): Synthesis and characterization. *Macromol. Biosci.* **2004,** 4, 1014-1020.

Chapitre 3

Elaboration et fonctionnalisation de matériaux nanofibreux à base de PHAs

3.1. Elaboration de fibres d'homopolymères de PHAs

Dans l'optique d'obtenir des fibres de polymères homogènes et sans défaut par « electrospinning », il est important de contrôler deux paramètres : la viscosité de la solution ainsi que sa conductivité afin que les forces électrostatiques surmontent les forces de tension de surface appliquées. Afin de mieux appréhender l'influence de ces différents paramètres, trois systèmes de solvants ont été utilisés : le chloroforme qui est le solvant classiquement utilisé pour solubiliser les PHAs, un mélange chloroforme/diméthylformamide du fait de propriétés de conduction différentes et enfin, le trifluoroéthanol afin de réaliser des fibres de PHAs de diamètre inférieur à 500 nm.

3.1.1. Solutions dans le chloroforme

Dans un premier temps, des mesures de viscosité dynamique et de conductivité ont été réalisées dans le chloroforme avec trois PHAs différents : le PHB (M_n = 330 000 g.mol^{-1}, I_p = 2), le PHBHV (M_n = 84 000 g.mol^{-1}, I_p = 2,4, 12 % de HV) et le PHBHHx (M_n = 206 000 g.mol^{-1}, I_p = 1,7, 9 % de HHx). Les résultats présentés dans le **Tableau 3-1** montrent que les mesures de conductivité pour les trois polymères sont du même ordre de grandeur (entre 6,28 µS.cm^{-1} et 6,45 µS.cm^{-1}). Ces faibles valeurs de conductivité sont en corrélation avec la faible constante diélectrique du chloroforme (ε = 4,81). Afin de les compenser, il est nécessaire de réaliser des solutions concentrées en polymères de manière à obtenir des valeurs de viscosité suffisamment élevées pour contrebalancer les forces de tension de surface.

Tableau 3-1 : Valeurs de viscosité et de conductivité à 25°C de différentes solutions de PHB, PHBHV et PHBHHx dans le chloroforme.

Polymères	Viscosité (cP)	Conductivité (µS.cm^{-1})
PHB 14 %(m/v)	725	6,39
PHBHV 20 % (m/v)	1790	6,33
PHBHV 30 % (m/v)	2900	6,45
PHBHHx 10 % (m/v)	3100	6,28

Les premières fibres de polymères générées par « electrospinning » au cours notre étude sont des fibres de PHB dont la morphologie est illustrée par les images de MEB de la **Figure 3-1**. **Les Figure 3-1a-c** montrent la bonne orientation des fibres dans le sens de rotation du collecteur à différents grossissements. Cependant, plusieurs défauts sont à remarquer tels que le collage de certaines fibres entres elles, l'hétérogénéité du diamètre des fibres mais surtout leur surface rugueuse et mal définie illustrée plus précisément par la **Figure 3-1d**. Cette topographie de surface hétérogène peut être une conséquence de la solubilisation difficile du PHB dans le chloroforme avec une concentration limite de 14 % (m/v). Cette faible solubilité, entraîne une viscosité de 725 cP, et conduit à la formation de fibres ayant un diamètre de 4,1 ± 0,7 µm.

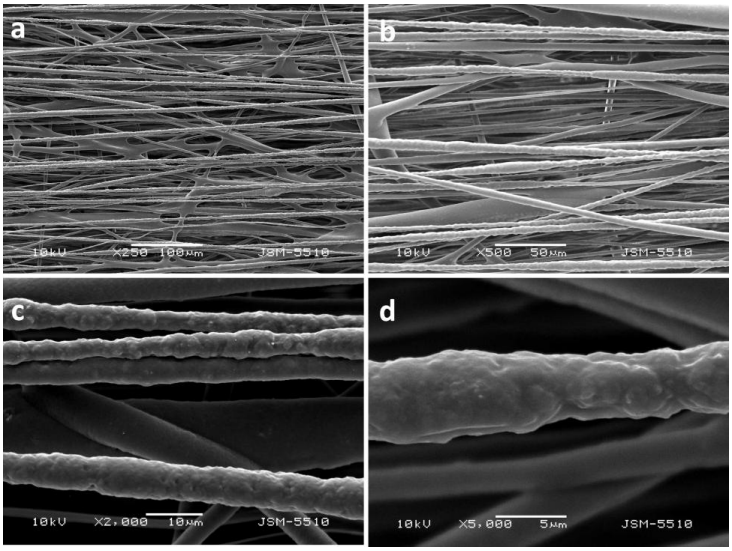


Figure 3-1 : Images de MEB de fibres de PHB. Conditions d' « electrospinning » : [PHB] = 14 % (m/v) dans $CHCl_3$, débit = 3 mL.h^{-1}, voltage = 25 kV, distance = 20 cm.

L'incorporation de monomère d'hydroxyvalérate au sein de la chaîne de PHB permet d'obtenir un copolymère statistique (PHBHV) dont la solubilité est améliorée par rapport à celle de l'homopolymère PHB. Tout d'abord, les premières expériences d' « electrospinning » à partir de ce polymère ont été conduites avec une solution à 20 % (m/v) de viscosité supérieure à celle de la solution de PHB avec une valeur de 1790 cP. La **Figure 3-2** illustre les deux premiers matériaux fibreux réalisés à base de PHBHV avec deux distances aiguille/collecteur (15 cm et 20 cm). En observant dans un premier temps le matériau réalisé avec une distance aiguille/collecteur de 15 cm, on remarque la bonne orientation des fibres ainsi que leur diamètre homogène. Cependant, grâce au grossissement x1000, il est possible de distinguer des zones d'adhérence entre fibres provoquées par une évaporation incomplète du solvant. Afin

d'évaporer le solvant en totalité, la distance aiguille/collecteur a été augmentée de 5 cm (**Figure 3-2**). Les fibres générées dans ces conditions sont alors indépendantes démontrant qu'une distance de 20 cm est requise afin d'évaporer complètement le chloroforme. Cependant, les fibres présentent des défauts avec l'apparition notamment de fuseaux caractéristiques des forces de tension de surface s'appliquant sur la longueur des fibres menant à leur désorganisation.

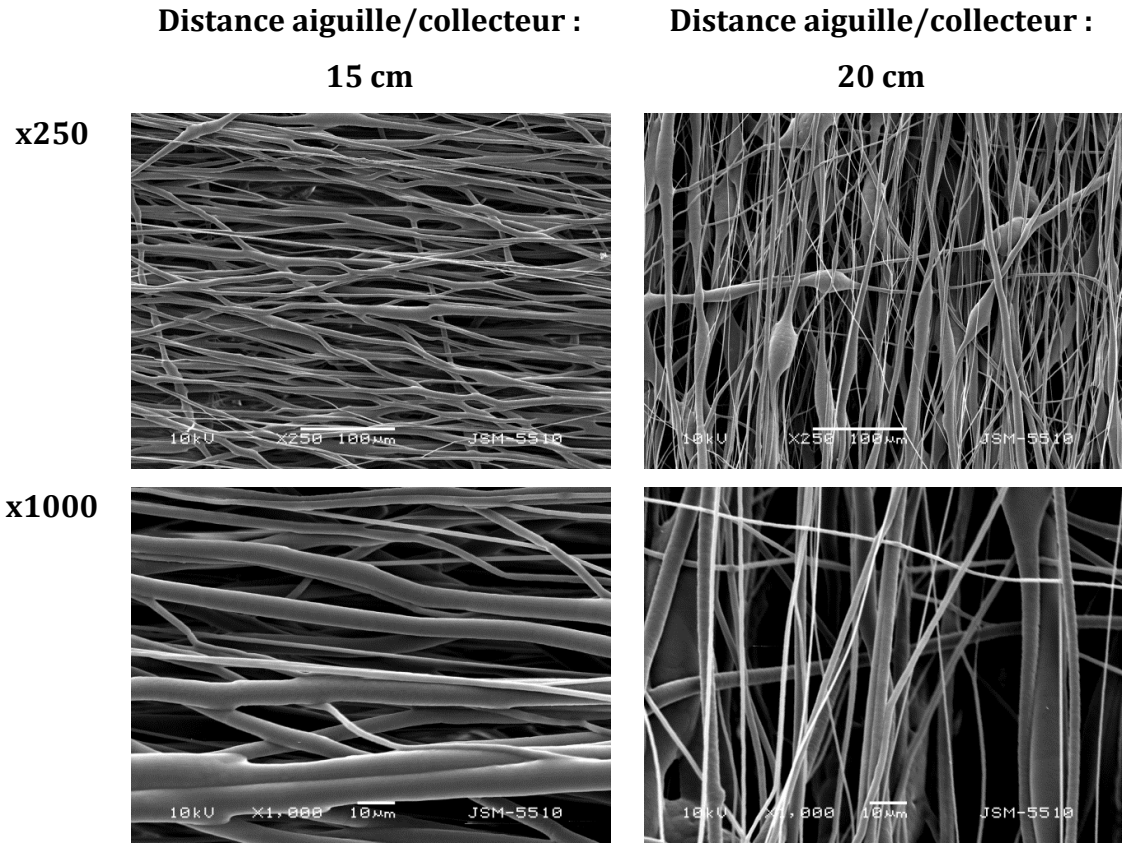


Figure 3-2 : Images de MEB de fibres de PHBHV. Conditions d' « electrospinning » : [PHBHV] = 20 % (m/v) dans $CHCl_3$, débit = 3 $mL.h^{-1}$, voltage = 25 kV.

Un moyen de contrebalancer les forces de tension de surface consiste à préparer une solution plus concentrée en PHBHV afin d'augmenter sa viscosité. Dans cette optique, une solution à 30 % (m/v) a ainsi été réalisée générant des fibres qui ne présentent aucun défaut et qui sont parfaitement orientées **(Figure 3-3)**. D'autre part, en observant la **Figure 3d**, on remarque que les fibres possèdent une surface lisse ainsi qu'une structure cylindrique homogène sur toute leur longueur. Le diamètre mesuré est de 4,5 ± 0,5 µm. La conductivité de la solution étant faible, une viscosité élevée de l'ordre de 2900 cP est nécessaire pour surmonter

les forces de tension de surface et produire une structure fibreuse bien définie. Cette viscosité élevée est à l'origine du diamètre relativement élevé des fibres.

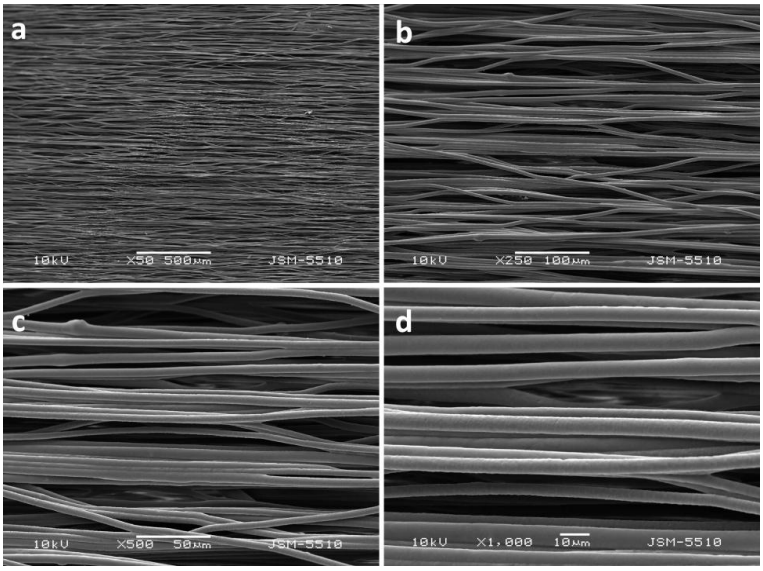


Figure 3-3 : Images de MEB de fibres de PHBHV. Conditions d' « electrospinning » : [PHBHV] = 30 % (m/v) dans $CHCl_3$, voltage = 25 kV, débit = 3 $mL.h^{-1}$, distance = 20 cm.

Dans l'optique d'élargir notre palette d'élaboration de matériaux fibreux à base de polymères biosourcés, les conditions de fabrication à partir d'un troisième candidat, le PHBHHx, ont également été déterminées. Ce copolymère possède des unités de répétition avec des chaînes latérales plus longues que le PHBHV et par conséquent présente un caractère moins cristallin que ce dernier. Grâce à l'étude précédente avec le PHBHV, nous avons mis en exergue la nécessité de préparer une solution de viscosité minimale de 2900 cP pour des solutions ayant une conductivité de l'ordre de 6,3 $\mu S.cm^{-1}$. Par conséquent, une solution à 10 % (m/v) en PHBHHx avec une viscosité de 3100 cP a été électrofilée. Dans un premier temps il est possible d'observer une parfaite orientation des fibres notamment sur la **Figure 3-4a**. Les **Figures 3-4b** et **3-4d** montrent que les fibres sont indépendantes en raison de la complète évaporation du solvant, mais aussi que leur structure est homogène avec une absence de défaut. La **Figure 3-4d** a permis de mesurer le diamètre moyen des fibres qui est égal à 3,0 ± 0,5 µm. On remarque aussi sur cette image la présence d'une rugosité de surface, probablement causée par une évaporation rapide du chloroforme.

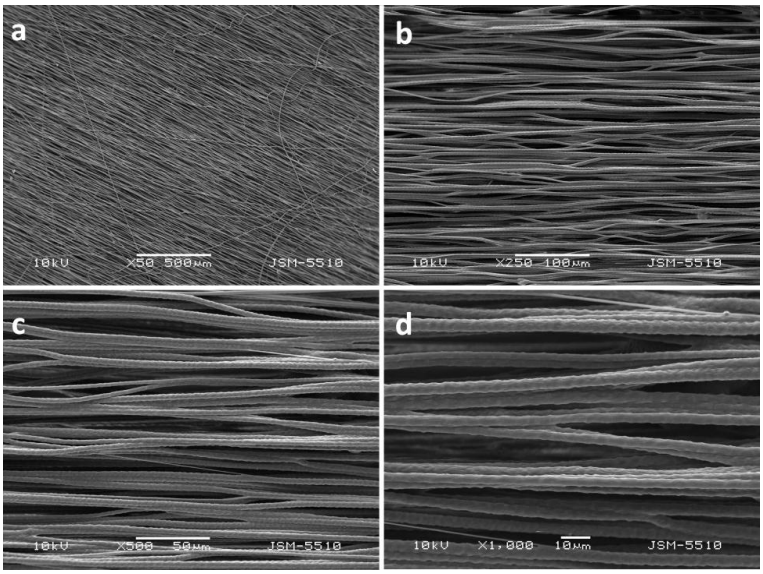


Figure 3-4 : Images de MEB de fibres de PHBHHx. Conditions d' « electrospinning » : [PHBHHx] = 10 % (m/v) dans $CHCl_3$, voltage = 25 kV, débit = 3 mL.h^{-1}, distance = 20 cm.

Les matériaux fibreux réalisés par « electrospinning » à partir de ces trois polymères ont été caractérisés dans un premier temps par des mesures d'angles de contact et de porosimétrie au mercure (**Tableau 3-2**). Tout d'abord, il est possible de constater l'augmentation de l'angle de contact des matériaux microfibreux à base de PHBHV et de PHBHHx avec un accroissement de 15° et 17° de leurs mesures respectives par rapport aux matériaux sous forme de films. Cette augmentation de l'hydrophobie peut être expliquée par la topographie des matériaux fibreux qui est à l'origine d'une surface spécifique plus élevée, décuplant ainsi les propriétés de surface. Par ailleurs, dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, il est intéressant d'obtenir des matériaux à forte porosité afin de permettre une diffusion efficace des nutriments et du milieu de culture. Le **Tableau 3-2** présente les résultats des analyses porosimétriques effectuées sur les fibres de PHBHV et PHBHHx avec des valeurs de porosité élevées de 66 % et 61 % ainsi qu'une gamme large de macropores (taille de pores entre 8 et 20 µm).

Tableau 3-2 : Caractéristiques morphologiques des matériaux fibreux.

Polymère	Diamètre des Fibres [a] (nm)	Angle de contact [b]	Taille de pores [c] (µm)	Porosité [c] (%)
PHBHV film	-	79 ° ± 2	-	-
PHBHHx film	-	78 ° ± 2	-	-
PHBHV	4500 ± 500	94 ° ± 2	8 – 20	66
PHBHHx	3000 ± 500	95 ° ± 4	8 – 20	61

[a] détermination par ImageJ sur une moyenne de 20 fibres observées par MEB
[b] moyenne sur 10 gouttes
[c] détermination par porosimétrie au mercure

D'autre part, les propriétés thermiques des matériaux ont été étudiées par TGA et DSC afin de déterminer les températures de dégradation et de fusion ainsi que leur cristallinité (**Tableau 3-3**). Dans un premier temps, les analyses par TGA montrent une température de dégradation plus faible pour les matériaux fibreux avec une baisse, respectivement de 6°C et 24 °C pour le PHBHV et le PHBHHx. Cette diminution de la température de dégradation mesurée est due à la plus grande surface spécifique des matériaux fibreux responsable d'un chauffage du matériau plus homogène. Les analyses par DSC révèlent une température ainsi qu'une enthalpie de fusion du PHBHV supérieures pour le matériau fibreux, respectivement de 4 °C et 8 J/g comparé à la poudre. Cette augmentation de la cristallinité peut être corrélée au phénomène d'étirement des macromolécules au cours de la formation des fibres favorisant la cristallisation de certains polymères.[1] Néanmoins, les valeurs similaires de cristallinité du PHBHHx sous forme de poudre ou de fibres montrent que sa cristallisation ne semble pas affectée par le procédé d' « electrospinning ».

Tableau 3-3 : Caractéristiques thermiques et cristallines des matériaux fibreux.

Polymère	$T_{d(max)}$ (°C) / Δm (m. %) [a]	T_g [b] (°C)	T_m [b] (°C)	ΔH_m [b] (J/g)
PHBHV poudre	275 / 50	-2	153	69
PHBHHx poudre	293 / 50	-7	137	60
PHBHV fibres	269 / 50	n.d.	157	77
PHBHHx fibres	269 / 50	n.d.	136	58

[a] détermination par TGA 10°C/min sous argon
[b] détermination par DSC avec un chauffage à 10°C/min (1er passage)
n.d. : non détecté

3.1.2. Solutions dans un mélange $CHCl_3$/DMF

L'utilisation du chloroforme comme solvant pour l'élaboration de matériaux tridimensionnels par « electrospinning » conduit à la formation de structures microfibreuses avec des diamètres de fibre de plusieurs micromètres. Il est possible de réduire le diamètre moyen des fibres en augmentant la conductivité de la solution. Dans cette perspective, nous avons utilisé un mélange de solvants par l'addition du DMF au chloroforme dans les proportions 80/20 (v/v) correspondant à la limite de solubilité des polymères. La conductivité de la solution a ainsi été considérablement augmentée en raison de la forte constante diélectrique du DMF (ε = 36,7), ce qui a permis aux forces électrostatiques exercées par le voltage, d'être plus efficaces, en étirant davantage les fibres de polymère, menant alors à la formation de structures au diamètre de fibres plus faible.

Le **Tableau 3-4** présente les valeurs de viscosité et de conductivité des solutions de polymères dans un mélange $CHCl_3$/DMF (80/20). La diminution de la viscosité des solutions de polymères résulte d'une moins bonne solubilité dans ce mélange.

Tableau 3-4 : Valeurs de viscosité et de conductivité à 25°C de différentes solutions de PHB, PHBHV et PHBHHx dans un mélange $CHCl_3$/DMF (80/20) :

Polymères	Viscosité (cP)	Conductivité ($\mu S.cm^{-1}$)
PHB 14 % (m/v)	640	23,40
PHBHV 25 % (m/v)	740	20,20
PHBHHx 8 % (m/v)	750	17,91

Les concentrations des solutions de polymères pour réaliser l' « electrospinning » à partir de ce mélange de solvants sont respectivement de 14 % (m/v), 25 % (m/v) et 8 % (m/v) pour le PHB, PHBHV et le PHBHHx. Il est important de remarquer l'augmentation de la distance aiguille/collecteur – en comparaison avec l'utilisation du chloroforme seul - passant de 20 cm à 25 cm en raison de la température de vaporisation élevée du DMF (T_{eb} = 153 °C).

La **Figure 3-5** présente les images de MEB des matériaux fibreux de PHB, PHBHV et PHBHHx réalisés à partir du mélange $CHCl_3$/DMF. Grâce à la première série d'images à faible grossissement (x500), il est possible de remarquer l'absence de défaut tel que des fuseaux. Plus précisément, avec les clichés à plus fort grossissement (x1 000, x2 000), nous pouvons observer la morphologie homogène, cylindrique et lisse des fibres. Le mélange $CHCl_3$/DMF permet ainsi d'élaborer des fibres de PHB régulières à la différence des fibres de la **Figure 3-1**. En outre, les

fibres présentent une certaine orientation dans le sens de rotation du collecteur bien que celle-ci soit moins prononcée en comparaison de celle des fibres électrofilées uniquement à partir de chloroforme. Ce résultat peut-être expliqué par le fait qu'une conductivité élevée des solutions entraîne un jet répondant davantage aux forces électrostatiques en sortie d'aiguille qui devient alors nettement plus instable.

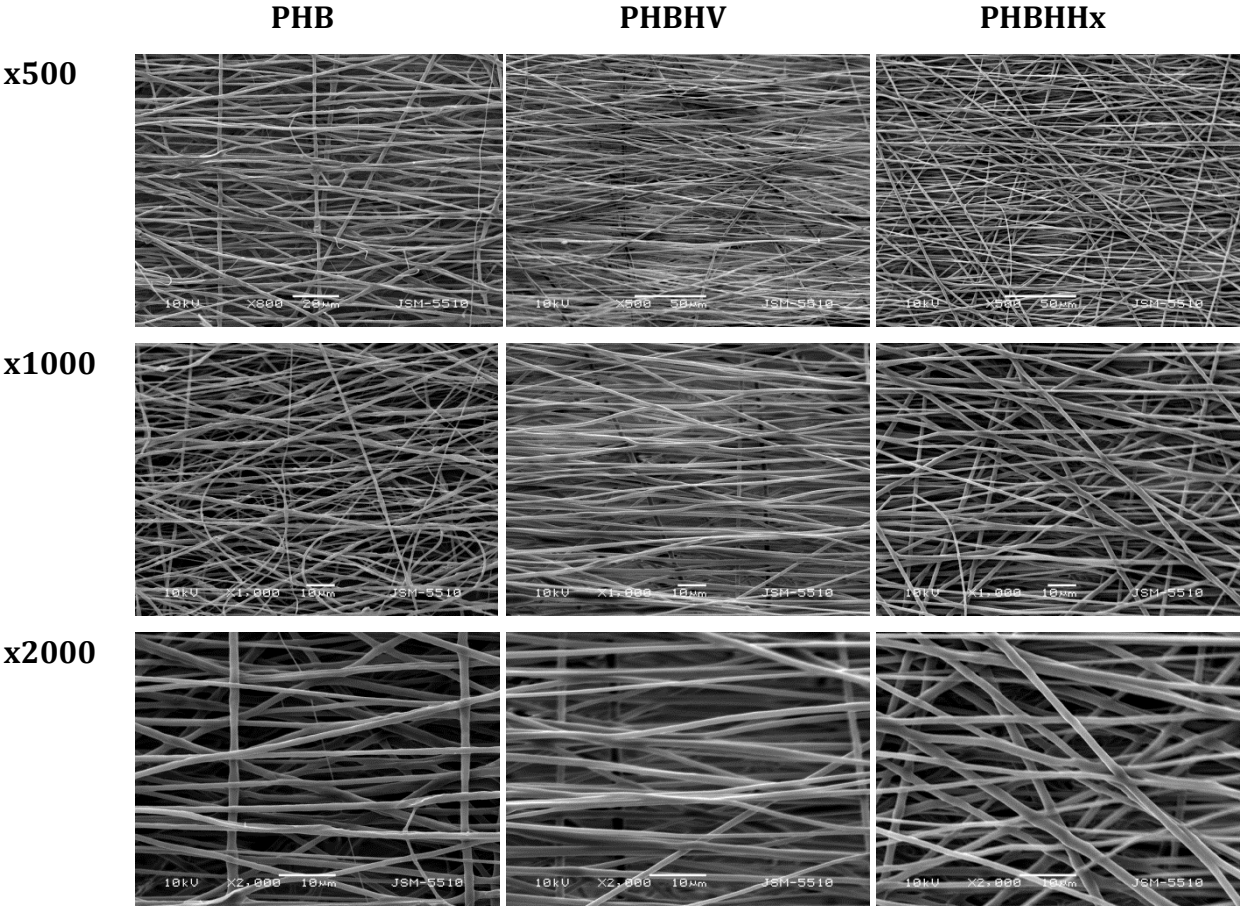


Figure 3-5 : Images de MEB de fibres de PHB, PHBHV et PHBHHx. Conditions d' « electrospinning » : [PHB] = 14 %, [PHBHV] = 25 %, [PHBHHx] = 8 % (m/v) dans un mélange $CHCl_3$/DMF (80/20), voltage = 25 kV, débit = 3 mL.h^{-1}, distance = 25 cm.

Malgré la faible viscosité des solutions, la conductivité élevée permet aux forces électrostatiques de surmonter les forces de tension de surface à la différence du premier système ($CHCl_3$) où la viscosité était le paramètre crucial. Les diamètres des fibres ont été mesurés et regroupés dans le **Tableau 3-5**. Comme attendu, les valeurs mesurées sont nettement plus faibles pour les fibres de PHB (950 nm) ainsi que pour les fibres de PHBHV et PHBHHx, respectivement 5 et 3,3 plus fines que lors de leur fabrication à partir d'une solution de

chloroforme. Les valeurs d'angles de contact de ces matériaux traduisent une augmentation de l'hydrophobie par rapport aux polymères sous forme de film pour les raisons déjà discutées précédemment (**Tableau 3-2**). Bien que le taux de porosité, de l'ordre de 60%, soit comparable avec les valeurs du **Tableau 3-2**, les tailles de pores (5-15 µm) des matériaux réalisés avec ce système sont plus faibles et resserrées. Selon Li *et al.*,[2] la diminution du diamètre des fibres réduit l'espace interfibres et donc la taille des pores.

Tableau 3-5 : Caractéristiques morphologiques des matériaux fibreux.

Polymère	Diamètre des Fibres [a] (nm)	Angle de contact [b]	Taille de pores [c] (µm)	Porosité [c] (%)
PHB film	-	80 ° ± 2	-	-
PHBHV film	-	79 ° ± 2	-	-
PHBHHx film	-	78 ° ± 2	-	-
PHB fibres	950 ± 160	120 ° ± 4	5 – 15	61
PHBHV fibres	800 ± 100	97 ° ± 2	6 – 15	61
PHBHHx fibres	900 ± 110	98 ° ± 2	6 – 13	60

[a] détermination par ImageJ sur une moyenne de 20 fibres observées par MEB
[b] moyenne sur 10 gouttes
[c] détermination par porosimétrie au mercure

Les caractérisations par TGA et DSC ont également été effectuées sur ces matériaux et sont résumées dans le **Tableau 3-6**. Les températures de dégradation des polymères sous forme de fibres sont plus faibles que pour les polymères sous forme de poudre comme précédemment détaillé dans le **Tableau 3-3**. La diminution de la température de dégradation associée à l'augmentation de la surface spécifique est dépendante du diamètre des fibres. En effet, la température de dégradation diminue de 8 °C entre le PHBHV électrofilé à partir du chloroforme et celui réalisé dans le mélange $CHCl_3$/DMF. Une variation de 12 °C est également établie pour les matériaux à base de PHBHHx. De manière similaire au **Tableau 3-3**, la cristallinité des échantillons fibreux à base de PHB et de PHBHV est supérieure par rapport aux matériaux sous forme de poudre et, par ailleurs, la cristallisation du PHBHHx n'est pas affectée.

Tableau 3-6 : Caractéristiques thermiques des matériaux fibreux.

Polymère	$T_{d(max)}$ (°C) / Δm (m. %) [a]	T_g [b] (°C)	T_m [b] (°C)	ΔH_m [b] (J/g)
PHB poudre	267 / 50	-6	169	65
PHBHV poudre	275 / 50	-2	153	69
PHBHHx poudre	293 / 50	-7	137	60
PHB	252 / 50	n.d.	170	72
PHBHV	261 / 50	n.d.	157	78
PHBHHx	257 / 50	n.d.	136	60

[a] détermination par TGA 10°C/min sous argon
[b] détermination par DSC avec un chauffage à 10°C/min (1er passage)
n.d. : non détecté

3.1.3. Solutions dans le trifluoroéthanol

Dans le procédé d' « electrospinning », le solvant est un facteur primordial pour la conception de matériaux homogènes. Les propriétés idéales sont : une faible température de vaporisation, une constante diélectrique élevée ainsi que l'absence de toxicité. Dans cette optique, le trifluoroéthanol (TFE) est un candidat de choix pour élaborer des fibres homogènes de quelques centaines de nanomètres grâce à sa température d'ébullition relativement faible (T_{eb} = 73,5 °C), sa forte constante diélectrique (ε = 26,1) et son caractère non toxique.

La conductivité de différentes solutions de polymères préparées dans le TFE a été mesurée et les valeurs sont résumées dans le **Tableau 3-7**. Nous pouvons observer les fortes valeurs de conductivité, comprises entre 73 µS.cm^{-1} et 89 µS.cm^{-1}, par rapport aux valeurs mesurées dans les autres systèmes (**Tableau 3-1** et **Tableau 3-4**)

Tableau 3-7 : Valeurs de viscosité et de conductivité à 25°C de différentes solutions de PHB, PHBHV et PHBHHx dans le TFE.

Polymères	Conductivité (µS.cm^{-1})
PHB 10 % (m/v)	89
PHBHV 15 % (m/v)	82
PHBHHx 8 % (m/v)	73
PHBHHx 10 % (m/v)	73

Dans un premier temps, les conditions adaptées à la réalisation d'un matériau fibreux à partir d'une solution de TFE ont été déterminées en utilisant le PHB à une concentration de 10 % (m/v), un voltage de 25 kV, une distance de 25 cm ainsi qu'un débit de 3 $mL.h^{-1}$. Les images de MEB correspondant à ces conditions sont répertoriées dans la **Figure 3-6** et montrent une structure fibreuse mal définie, composée de fibres collées entre elles, en raison d'une évaporation du solvant incomplète. Dans le but de résoudre ce problème, le débit a été réduit à 1 $mL.h^{-1}$ afin de générer des fibres indépendantes avec une surface homogène et lisse (**Figure 3-6)**. Le degré d'orientation des fibres dans le sens de rotation du collecteur est faible pour les raisons déjà évoquées précédemment avec le système $CHCl_3$/DMF (section 3.1.2), d'autant plus que la conductivité est encore plus élevée.

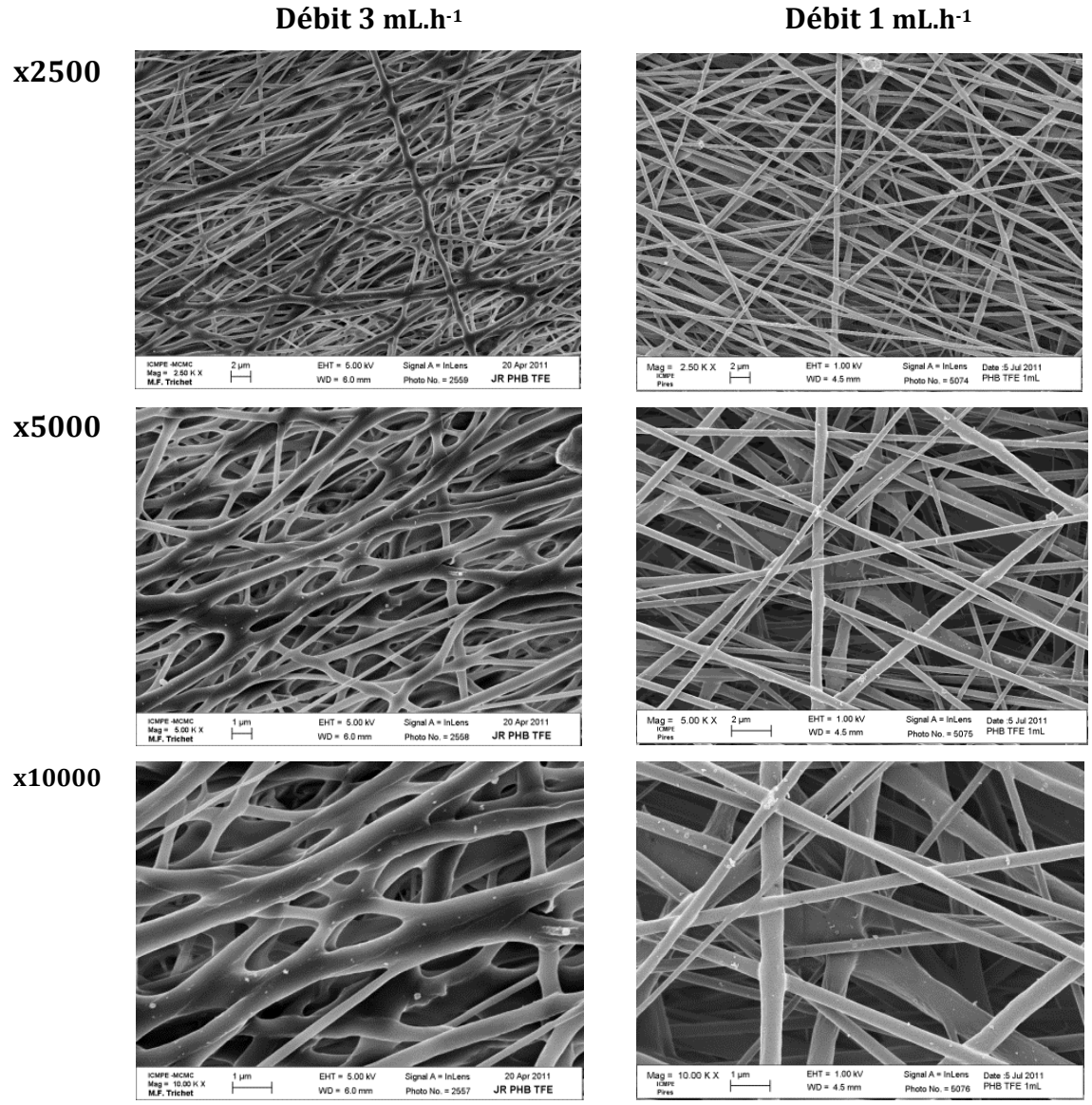


Figure 3-6 : Images de MEB de fibres de PHB. Conditions d' « electrospinning » : [PHB] = 10 % (m/v) dans le TFE, voltage = 25 kV, distance = 25 cm.

Par la suite, d'autres matériaux fibreux à base de PHBHV et PHBHHx ont été préparés en utilisant le TFE (**Figure 3-7**). Dans tous les cas, des matériaux tridimensionnels fibreux homogènes et bien définis ont pu être réalisés avec différentes concentrations en polymères. Afin de générer des fibres à partir d'une solution de PHBHV, une concentration minimale de 15 % (m/v) est nécessaire. La masse molaire plus faible (M_n = 90 000 g.mol^{-1}) en comparaison de celle du PHB et du PHBHHx implique la préparation de solutions plus concentrées pour favoriser l'enchevêtrement des chaînes. D'autre part, la **Figure 3-7** présente aussi les images de MEB de fibres à base de PHBHHx réalisées à partir de concentrations différentes. Une première différence notable est l'apparition d'une polydispersité du diamètre des fibres supérieure dans le cas d'une solution à 8 % (m/v) avec la formation, en grande quantité, de fibres d'un diamètre d'environ 680 nm mais aussi de fibres plus fines d'environ 300 nm. Ce phénomène n'apparaît pas lors de l' « electrospinning » d'une solution à 10 % (m/v) avec la formation de fibres avec un diamètre monodisperse d'environ 900 nm (**Tableau 3- 8**).

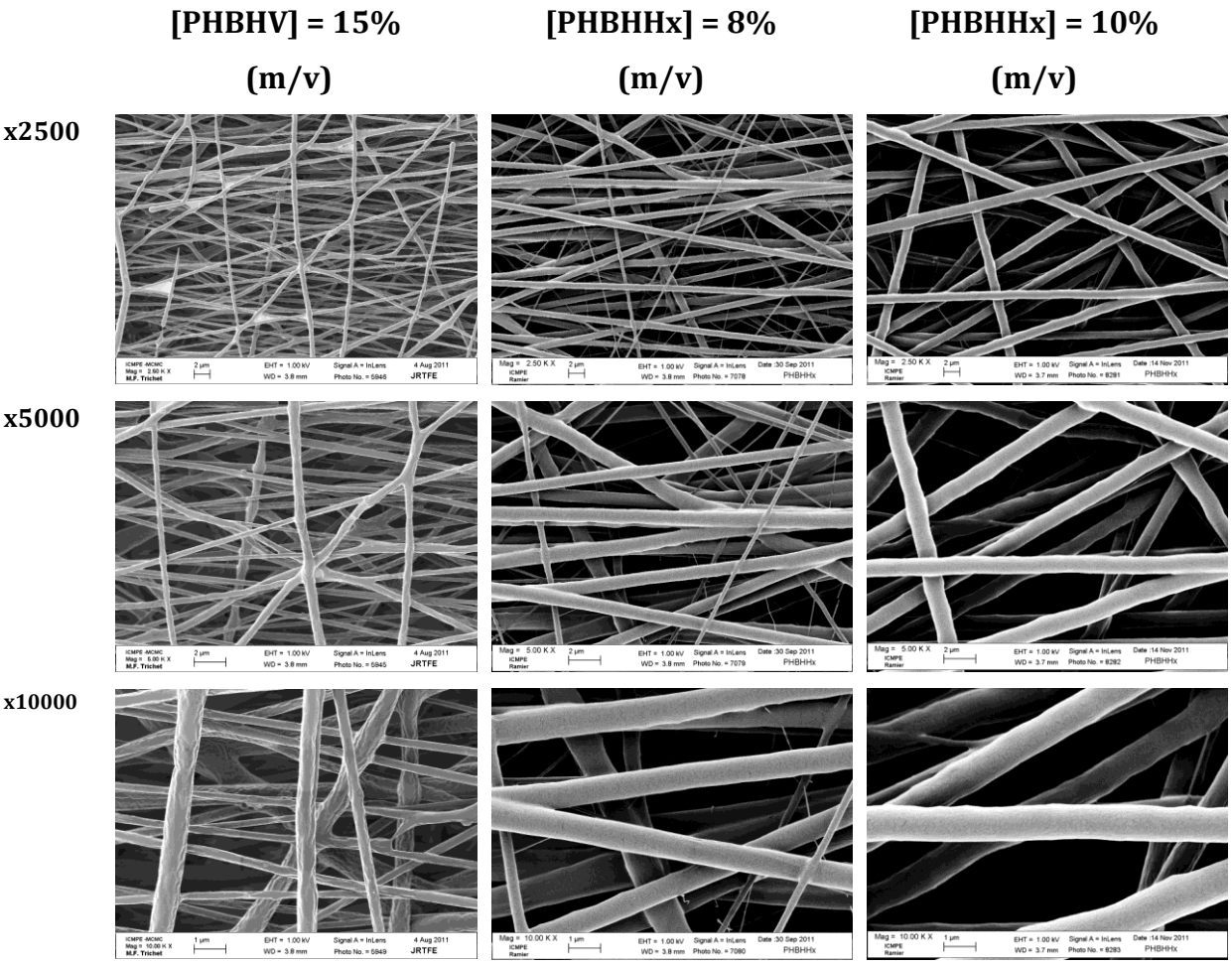


Figure 3-7 : Images de MEB de fibres de PHBHV et PHBHHx . Conditions d'« electrospinning »: solvant = TFE, voltage = 25 kV, débit = 1,5 mL.h^{-1}, distance = 25 cm.

Les diamètres des fibres des matériaux réalisés à partir d'une solution de TFE sont présentés dans le **Tableau 3-8**. Nous pouvons remarquer que la taille des fibres est nettement inférieure (environ 420 nm pour le PHB et le PHBHV) comparé aux précédents systèmes étudiés. En outre, selon le même principe que celui invoqué pour les matrices à base de PHBHHx, la conductivité élevée générée par ce solvant permettrait de travailler avec une large gamme de concentrations de polymère et, par conséquent, de produire des matériaux fibreux de diamètre de fibres allant de quelques centaines de nanomètres (faibles concentrations) jusqu'à l'échelle du micron (fortes concentrations). Les mesures d'angles de contact montrent à nouveau l'augmentation de l'hydrophobie comparée aux matériaux sous forme de films. De manière plus intéressante, on peut remarquer également cette augmentation en comparant les fibres de PHBHV et de PHBHHx réalisées à partir de TFE avec celles fabriquées avec les autres solvants. Ces variations de 10 ° pour le PHBHV et 6 ° pour le PHBHHx semblent être imputables à deux caractéristiques : l'augmentation de la surface spécifique associée à des fibres plus fines mais aussi le degré d'orientation plus faible. Le **Tableau 3-8** présente également les mesures de porosimétrie. Des porosités entre 54 % et 65 % ont été évaluées ainsi que différentes tailles de pores en fonction du diamètre des fibres. Par ailleurs, il est possible de remarquer l'influence du degré d'orientation sur la taille des pores en comparant le PHBHHx Fibres 10 % avec le PHBHHx réalisées à partir du mélange $CHCl_3$/DMF. En effet, bien que les deux matériaux soient composés de fibres ayant un diamètre du même ordre de grandeur (900 nm) les gammes de pores sont nettement différentes avec 1,5 – 5 µm pour le PHBHHx 10 % et 5 – 13 pour le PHBHHx issu d'une solution de $CHCl_3$/DMF et les fibres plus orientées dans le sens de rotation du collecteur.

Tableau 3-8 : Caractéristiques morphologiques des matériaux fibreux.

Polymère	Diamètre des Fibres [a] (nm)	Angle de contact [b]	Taille de pores [c] (µm)	Porosité [c] (%)
PHB film	-	80 ° ± 2	-	-
PHBHV film	-	79 ° ± 2	-	-
PHBHHx film	-	78 ° ± 2	-	-
PHB fibres	420 ± 70	118 ° ± 6	0,4 - 2	62
PHBHV fibres	420 ± 50	107 ° ± 5	0,7 - 4	54
PHBHHx fibres 8%	680 ± 160	101° ± 3	1 - 4	65
PHBHHx fibres 10%	900 ± 55	95 ° ± 5	1,5 - 5	62

[a] détermination par ImageJ sur une moyenne de 20 fibres observées par MEB
[b] moyenne sur 10 gouttes
[c] détermination par porosimétrie au mercure

Les caractérisations par TGA et DSC (**Tableau 3-9**) révèlent des propriétés physiques et thermiques différentes en fonction de la nature et la forme du matériau déjà discutées lors des sections précédentes pour les **Tableaux 3-3 et 3-6** (section 3.1.1 et 3.1.2).

Tableau 3-9 : Caractéristiques thermiques des matériaux fibreux.

Polymère	$T_{d(max)}$ **(°C) / Δm (m. %)** [a]	T_g [b] **(°C)**	T_m [b] **(°C)**	ΔH_m [b] **(J/g)**
PHB poudre	267 / 50	-6	169	65
PHBHV poudre	275 / 50	-2	153	69
PHBHHx poudre	293 / 50	-7	137	60
PHB fibres	246 / 50	n.d.	171	73
PHBHV fibres	256 / 50	n.d.	157	79
PHBHHx fibres 8 %	254 / 50	n.d.	135	62
PHBHHx fibres 10 %	257 / 50	n.d.	133	63

[a] détermination par TGA 10°C/min sous argon
[b] détermination par DSC avec un chauffage à 10°C/min (1er passage)
n.d. : non détecté

3.2. Matériaux fibreux à porosité contrôlée

Un moyen d'ajuster la morphologie des matériaux réalisés par « electrospinning », notamment la porosité et la surface spécifique, consiste à mélanger deux partenaires pour ensuite en éliminer un sélectivement. Les modifications des caractéristiques des matériaux fibreux sont alors corrélées à la nature de l'agent porogène et à sa proportion.

3.2.1. Mélange PHA / PEO

Dans un premier temps, l' « electrospinning » de tels matériaux a été réalisé partir de solutions à 15 % (m/v) constituées de mélanges PHBHV/PEO 85/15 (m/m) et 50/50 (m/m) dans le TFE. Les valeurs de conductivité diminuent avec la quantité de PEO (M_v = 100 000 g.mol^{-1}) (**Tableau 3-10**). D'autre part, la conductivité apportée par le PHBHV est vraisemblablement liée aux procédés de purification de ces polyesters bactériens qui impliquent l'utilisation de diverses solutions, responsables de l'adsorption d'ions.

Tableau 3-10 : Valeurs de conductivité à 25°C des solutions de polymère.

Polymères	Conductivité dans le TFE (µS.cm^{-1})
PHBHV 15 % (m/v)	82
PHBHV-PEO 85-15 (m/m) 15 % (m/v)	65
PHBHV-PEO 50-50 (m/m) 15 % (m/v)	37
PEO 15 % (m/v)	18

Il est important de préciser que, pour la solution de PHBHV et les deux solutions contenant un mélange PHBHV/PEO, les conditions d'« electrospinning » sont identiques (voltage = 25 kV, débit = 1,5 mL.h^{-1}, distance = 25 cm) et permettent d'obtenir des fibres orientées et une structure relativement homogène. La structure chimique des matériaux fibreux PHBHV-PEO a été analysée par IRTF avant et après extraction du PEO, utilisé comme agent porogène. A titre d'exemple, la **Figure 3-8** représente les spectres IRTF du mélange PHBHV-PEO (50/50) avant et après lavage. La bande de vibration principale permettant de distinguer le PHBHV du PEO se situe à 2880 cm^{-1} correspondant aux liaisons C-H sp^3 du PEO. Après lavage du matériau dans de l'eau distillée à 40 °C pendant 24 heures, on observe sur la **Figure 3-8** la disparition de la bande caractéristique du PEO dans cette zone et l'apparition des bandes de vibration des liaisons C-H du PHBHV à 2976 cm^{-1} et 2934 cm^{-1} attestant d'une extraction quantitative. D'autre part, des mesures gravimétriques confirment l'efficacité des extractions avec des pertes de masse de 15 % et 47 % pour les matériaux fibreux de PHBHV- PEO (85/15, m/m) et PHBHV- PEO (50/50, m/m).

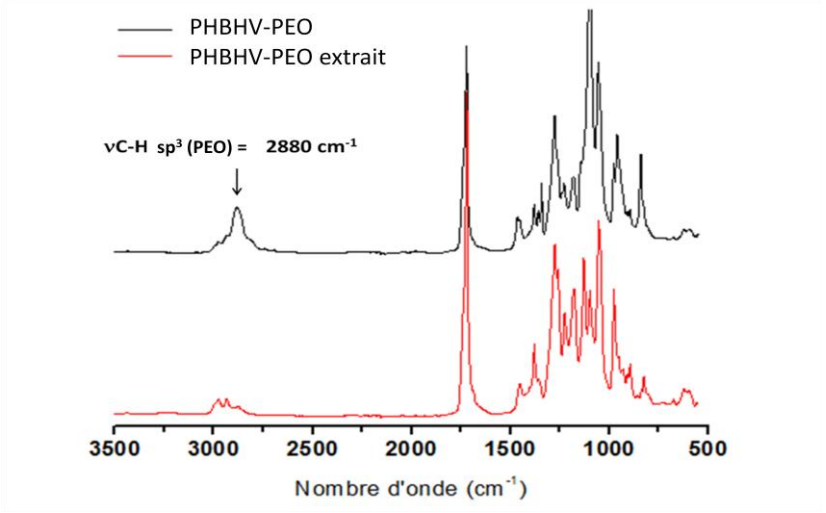


Figure 3-8 : Spectre IRTF du mélange PHBHV-PEO (50-50, m/m) avant et après lavage (24 heures à 40 °C dans H_2O)

Dans le but de confirmer l'extraction quantitative du PEO, des analyses RMN ^{1}H des matériaux avant et après lavage ont été effectuées (**Figure 3-9**). Nous retrouvons les bandes caractéristiques du PHBHV mais aussi celle caractéristique des protons $-CH_2-CH_2-O-$ du PEO observable à 3,64 ppm (**Figure 3-9a)**. Après lavage, nous pouvons remarquer la disparition totale de cette dernière bande.

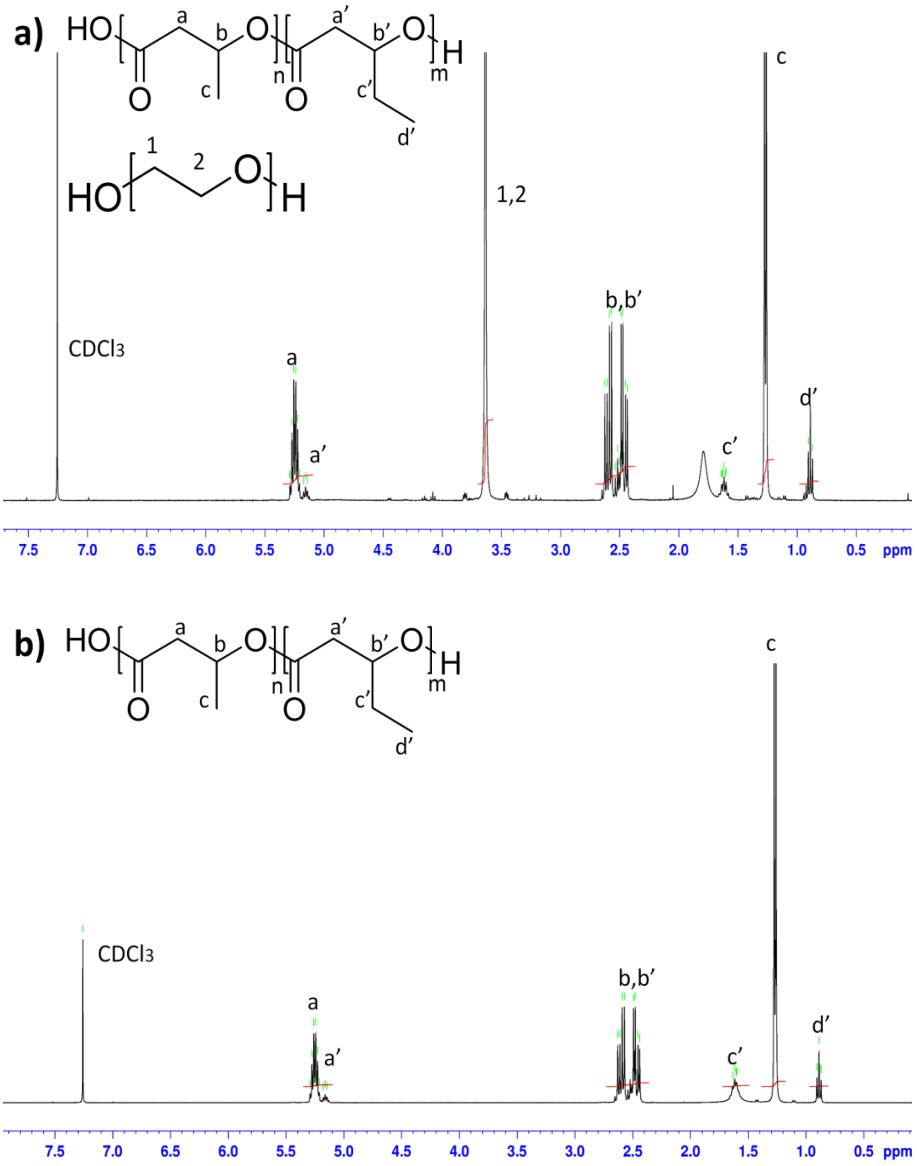


Figure 3-9 : Spectres RMN ^{1}H du mélange PHBHV-PEO (50-50, m/m). a) avant lavage b) après lavage (24 heures à 40 °C dans H_2O)

Les fibres formées à partir d'une solution à 15 % (m/v) d'un mélange PHBHV-PEO (85/15, m/m) dans le TFE ont été analysées par MEB avant et après extraction (**Figure 3-10**). A

faible grossissement (x5000), il n'apparaît pas de changement de morphologie du matériau. Cependant, après extraction de l'agent porogène, les images à plus fort grossissement montrent l'apparition d'une nanoporosité sur la surface des fibres avec une gamme de pores compris entre 50 nm et 80 nm.

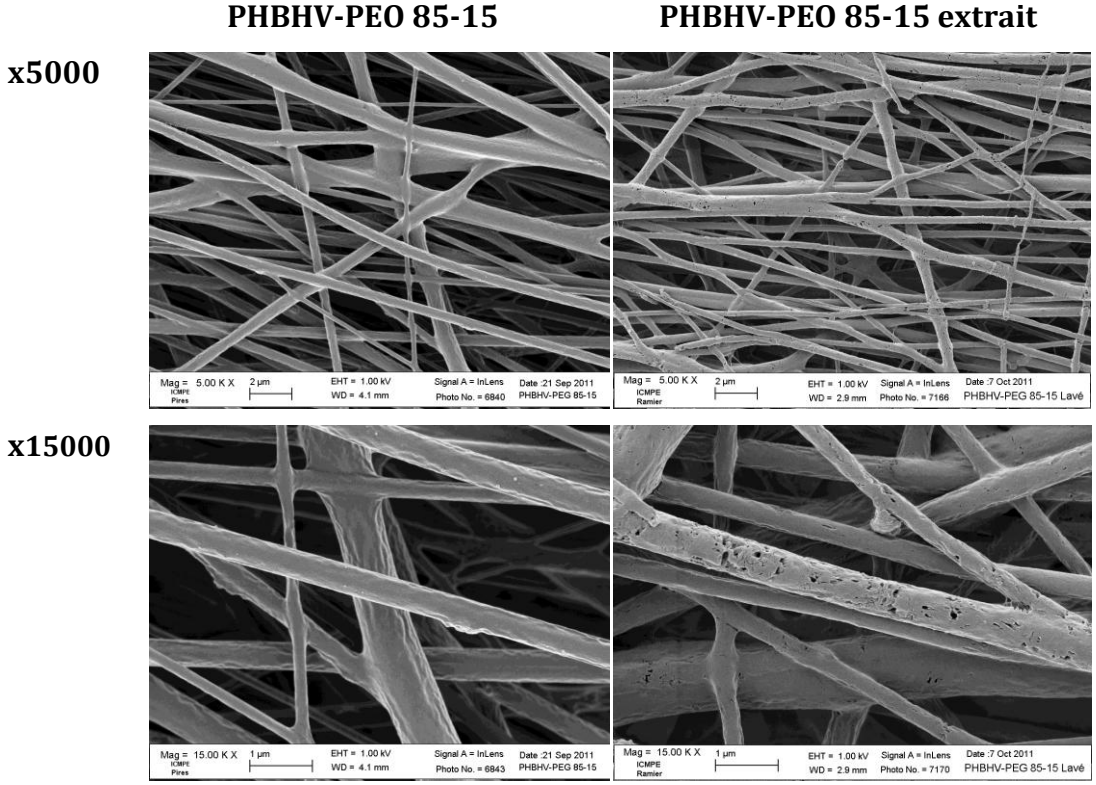


Figure 3-10 : Images de MEB de fibres de PHBHV-PEO (85/15, m/m) avant et après extraction (24 heures à 40 °C dans H_2O). Conditions d' « electrospinning » : [Polymères] = 15 % (m/v) dans TFE, voltage = 25 kV, débit = 1,5 mL.h^{-1}, distance = 25 cm.

Les mesures du diamètre des fibres ainsi que celles de l'angle de contact sont présentées dans le **Tableau 3-11**. Tout d'abord, nous pouvons observer une diminution du diamètre des fibres de l'ordre de 110 nm après extraction ce qui peut être expliqué par le fait que les deux polymères (PHBHV et PEO) sont immiscibles (confirmé par DSC, non montré ici). En effet, pendant le processus de formation des fibres, le PEO se retrouve alors expulsé en surface réduisant donc le diamètre une fois les fibres lavées. Une autre preuve démontrant l'absence de PEO dans le matériau lavé est l'augmentation très nette de l'angle de contact, variant de 0 ° à 98 °, ce qui est de l'ordre de grandeur de celui du PHBHV.

Tableau 3-11 : Caractéristiques des matériaux fibreux réalisés.

Matériaux	Diamètre [a] (nm)	Angle de contact [b]
PHBHV	420 ± 50	107 ° ± 5
PHBHV-PEO (85-15)	650 ± 76	0 °
PHBHV-PEO (85-15) extrait	540 ± 97	98 ° ± 4

[a] détermination par ImageJ sur une moyenne de 20 fibres observées par MEB
[b] moyenne sur 10 gouttes

Par ailleurs, le **Tableau 3-12** regroupe les mesures de porosimétrie au mercure et d'adsorption d'azote. Les résultats ne montrent pas d'augmentation de la porosité (68 % avant et après extraction) ni d'augmentation de la taille des pores. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que le matériau se rétracte après lavage compensant alors le volume libéré par le PEO. Cependant, une diminution de l'aire spécifique après extraction est démontrée par les mesures d'adsorption d'azote. La raison de cette variation réside dans la forte immiscibilité des polymères engagés dans la formation des fibres, ce qui donne lieu à une compétition entre deux phénomènes :

- d'une part, une expulsion du PEO en surface des fibres de PHBHV,
- et d'autre part, la formation de deux types de fibres de nature distincte, la majorité correspondant au PHBHV. Après lavage, les fibres de PEO se solubilisent laissant seulement les fibres de PHBHV et réduisant par conséquent la surface spécifique.

Tableau 3-12 : Caractéristiques de la porosité des matériaux fibreux issus des mélanges PHBHV/PEO.

Matériaux	Taille de pores [a] (µm)	Volume poreux [a] (mL/g)	Porosité [a] (%)	Aire spé. [b] (m^2/g)
PHBHV	0,7 – 4	1,7	54	57
PHBHV-PEO (85-15)	0,5 - 1,1	2,6	68	107
PHBHV-PEO (85-15) extrait	0,3 – 1,1	3,5	68	21

[a] détermination par porosimétrie au mercure
[b] détermination par adsorption d'azote (méthode BET : 77 °K)

Dans la perspective d'augmenter la porosité du matériau fibreux mais aussi le diamètre des mésopores au sein des fibres, la quantité de PEO a été augmentée afin d'atteindre un rapport PHBHV/PEO de 50/50 (m/m). La **Figure 3-11** représente les images de MEB de ce matériau avant et après extraction. Tout d'abord, nous pouvons remarquer qu'aucun changement significatif de la morphologie des fibres n'apparaît à faible comme à fort grossissement où la présence de nanopores était observable précédemment.

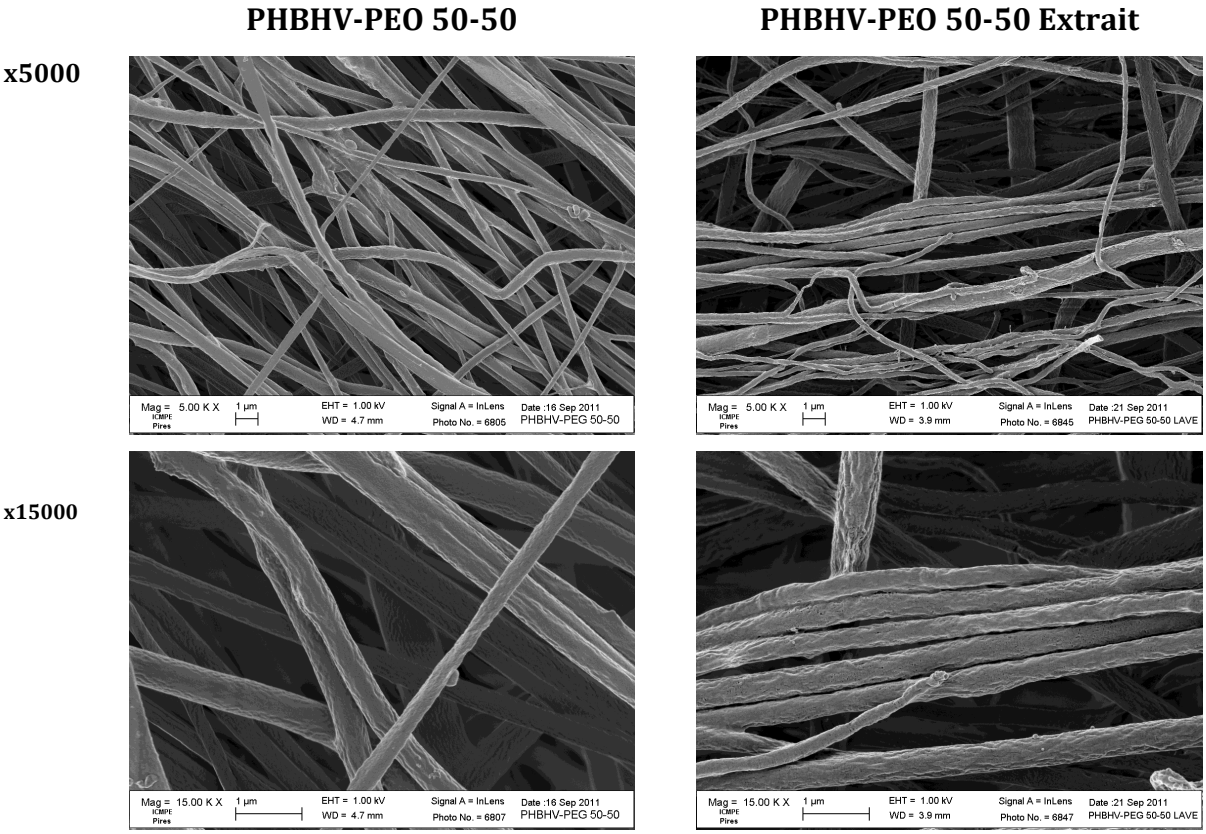


Figure 3-11 : Images de MEB de fibres de PHBHV-PEO (50/50, m/m) avant et après extraction (24 heures à 40 °C dans H_2O). Conditions d' « electrospinning » : [Polymère] = 15 % (m/v) dans TFE, voltage = 25 kV, débit = 1,5 mL.h^{-1}, distance = 25 cm.

Les valeurs du diamètre des fibres et de l'angle de contact réalisées sont présentées dans le **Tableau 3-13**. Comme précédemment, nous pouvons observer la diminution du diamètre des fibres de l'ordre de 64 nm après lavage, ainsi que l'absence de PEO au sein du matériau extrait augmentant nettement l'angle de contact de 0 ° à 99 °.

Tableau 3-13 : Caractéristiques des matériaux fibreux issus des mélanges PHBHV/PEO.

Matériaux	Diamètre [a] (nm)	Angle de contact [b]
PHBHV	420	107 ° ± 5
PHBHV-PEO (50-50)	416	0 °
PHBHV-PEO (50-50) extrait	352	99 ° ± 3

[a] détermination par ImageJ sur une moyenne de 20 fibres observées par MEB
[b] moyenne sur 10 gouttes

La plus forte proportion de PEO au sein du matériau initial (passant de 15 % à 50 % (m/m)) entraîne une nette augmentation de la taille de pores après extraction, malgré la rétractation du mat (d'un facteur 4 par rapport au cas précédent). D'autre part, cette augmentation est corrélée avec l'accroissement de la porosité passant de 73 % à 82 %. Enfin, de manière similaire au matériau constitué de 15 % (m/m) en PEO, les mesures d'adsorption d'azote indiquent une diminution de la surface spécifique.

Tableau 3-14 : Caractéristiques de la porosité des matériaux fibreux issus des mélanges PHBHV/PEO.

Matériaux	Taille de pores [a] (µm)	Volume poreux [a] (mL/g)	Porosité [a] (%)	Aire spé. [b] (m^2/g)
PHBHV	0,7 – 4	1,7	54	57
PHBHV-PEO (50-50)	0,2 – 1,1	4,3	73	65
PHBHV-PEO (50-50) extrait	1 - 4	3,7	82	32

[a] détermination par porosimétrie au mercure
[b] détermination par adsorption d'azote (méthode BET : 77 °K)

3.2.2. Mélange PHA / PLA

L'élaboration de matériaux à double porosité peut également être réalisée par une hydrolyse sélective de l'un des deux partenaires électrofilés. Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à la formation de fibres de PHAs nanoporeuses en utilisant le PLA (M_n = 80 000 $g.mol^{-1}$, I_p = 1,8) comme agent porogène.

L' « electrospinning » de tels matériaux a été réalisé partir de solutions à 15 % (m/v) de mélanges PHBHV/PLA de rapports 85/15 (m/m) et 50/50 (m/m) dans le TFE. Il est possible de remarquer dans le **Tableau 3-15**, présentant les valeurs de conductivité des solutions électrofilées, la diminution de la conductivité avec l'augmentation de la quantité de PLA dans le mélange, dont la conductivité intrinsèque est très inférieure à celle du PHBHV, certainement causée par des procédés de purification différents entre les deux polymères.

Tableau 3-15 : Valeurs de viscosité et de conductivité à 25°C de solutions de PHBHHx

Polymères	**Conductivité dans le TFE ($\mu S.cm^{-1}$)**
PHBHV 15 % (m/v)	82
PHBHV-PLA 85-15 (m/m) 15 % (m/v)	61
PHBHV-PLA 50-50 (m/m) 15 % (m/v)	32
PLA 15 % (m/v)	9

L'hydrolyse sélective du PLA s'effectue en conditions basiques dans un mélange MeOH/H_2O (40/60, v/v) contenant 0,1 M de NaOH à température ambiante. La **Figure 3-12** représente la cinétique de perte de masse des matériaux fibreux composés de PHBHV et de PLA à différentes concentrations. Nous pouvons observer que le matériau à base de PLA se dégrade totalement après 45 minutes tandis que les fibres de PHBHV n'ont subi aucune dégradation. De plus, des pertes de masse de 15 % et 46 % ont été déterminées pour les matériaux composés respectivement de 15 % et 50 % en PLA correspondant à sa dégradation totale dans le matériau fibreux. De manière similaire, Renard *et al.*[3] ont mis en évidence sur des films constitués de différents mélanges PLA/PHBHV et PLA/PHO, l'élimination rapide du PLA alors que les polyesters bactériens restent insensibles à l'hydrolyse.

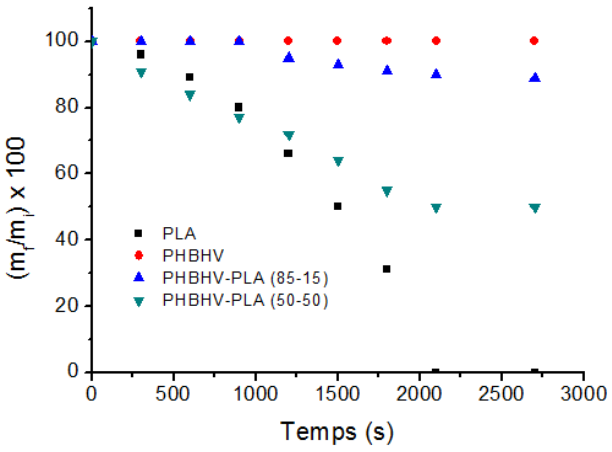
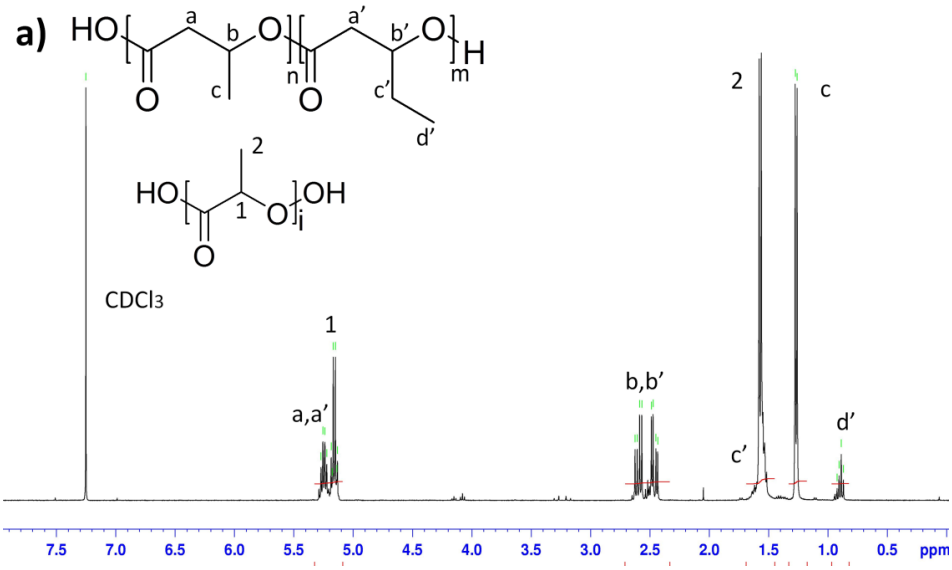


Figure 3-12 : Cinétique d'hydrolyse du PLA dans les matériaux fibreux. Conditions d'hydrolyse :T. amb. dans MeOH/H_2O (40/60, v/v) avec 0,1 M de NaOH.

Dans le but de confirmer la dégradation hydrolytique totale du PLA, des analyses par RMN du proton des matériaux avant et après dégradation ont été effectuées (**Figure 3-13**). A partir du matériau de départ, nous observons les bandes caractéristiques du PHBHV et celles caractéristiques du –C*H*$_3$ et du –C*H* du PLA à, respectivement 1,55 et 5,18 ppm (**Figure 3-13a**). Après 45 minutes d'hydrolyse, la disparition du pic du PLA atteste d'une dégradation efficace et complète (**Figure 3-13b**).



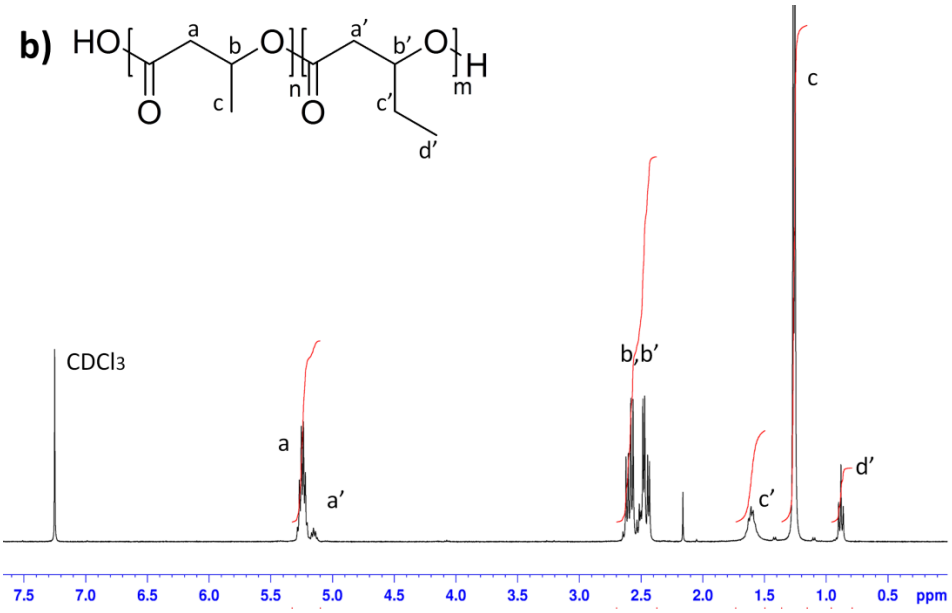


Figure 3-13 : Spectres RMN ^{1}H du mélange PHBHV-PLA (50-50, m/m). a) avant hydrolyse b) après hydrolyse (45 minutes, T. amb. dans MeOH/H_2O (40/60, v/v) avec 0,1 M de NaOH)

Les premières fibres élaborées avec ce système sont issues d'une solution à 15 % (m/v) d'un mélange PHBHV-PLA (85/15, m/m) dans le TFE. Le matériau fibreux a été analysé par MEB avant et après l'hydrolyse du PLA (**Figure 3-14**). A faible grossissement (x5000), il n'apparaît aucun changement de morphologie du matériau après dégradation sélective. La structure du matériau a résisté à l'hydrolyse avec l'absence de fibres de PHBHV cassées ou dégradées. Cependant, les images à plus fort grossissement montrent l'apparition d'une nanoporosité sur la surface des fibres ayant subi l'hydrolyse des chaînes de PLA, avec une gamme de pores compris entre 10 nm et 25 nm. Dans ce cas, le PLA a joué son rôle de porogène au sein même des fibres avec des zones hydrolysables capables de générer des nanopores.

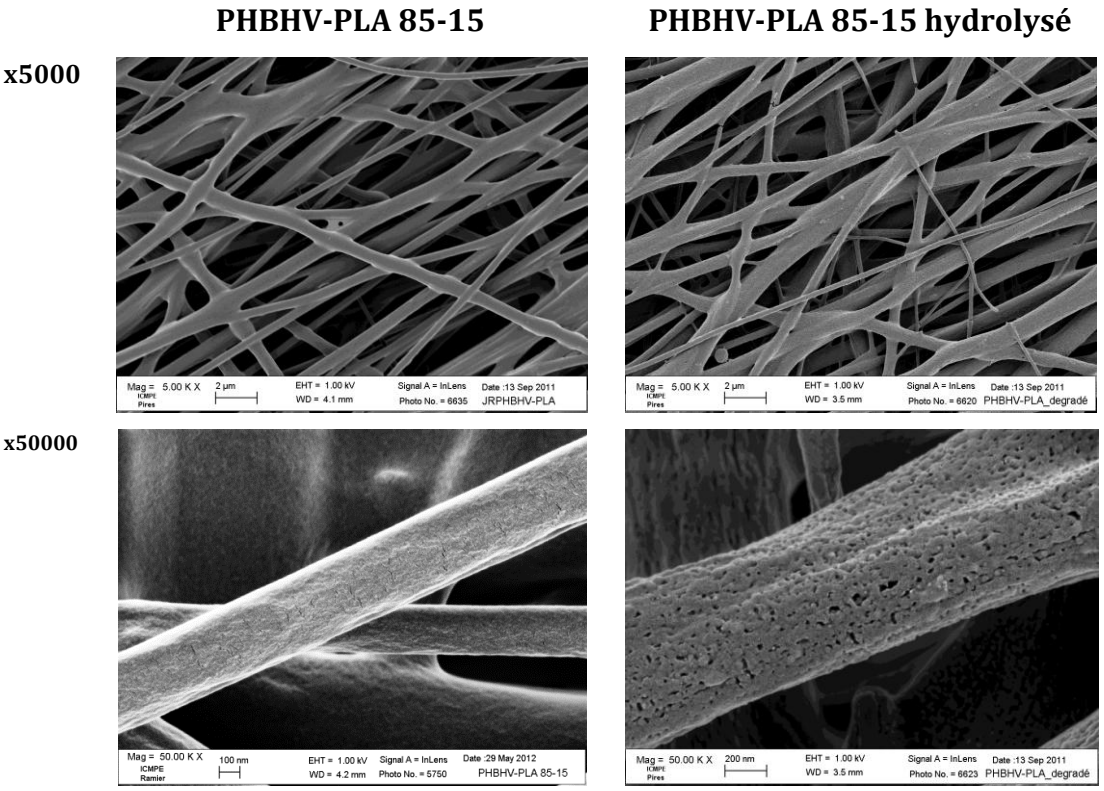


Figure 3-14 : Images de MEB de fibres de PHBHV-PLA (85/15, m/m) avant et après hydrolyse sélective du PLA (45 minutes, T. amb. dans MeOH/dH_2O (40/60, v/v) avec 0,1 M de NaOH). Conditions d' « electrospinning » : [polymère] = 15 % (m/v) dans TFE, voltage = 25 kV, débit = 1,5 mL.h^{-1}, distance = 25 cm.

Les mesures du diamètre des fibres ainsi que celles de l'angle de contact sont présentées dans le **Tableau 3-16**. Tout d'abord, nous pouvons observer la légère diminution du diamètre des fibres de l'ordre de 56 nm après dégradation sélective, ce qui peut être expliqué par la présence de PLA en surface des fibres de PHBHV. En effet, pendant le processus de formation des fibres la faible proportion de PLA se retrouve alors repoussée en surface. D'autre part, en raison de l'hydrophobicité du PHBHV et du PLA, les valeurs d'angles de contact mesurées avant et après hydrolyse ne varient pas et sont de l'ordre de 110°.

Tableau 3-16 : Caractéristiques des matériaux fibreux issus des mélanges PHBHV/PLA.

Matériaux	Diamètre [a] (nm)	Angle de contact [b]
PHBHV	420	107 ° ± 5
PHBHV-PLA (85-15)	637	112 ° ± 4
PHBHV-PLA (85-15) hydrolysé	581	110 ° ± 5
PLA	700	111 ° ± 5

[a] détermination par ImageJ sur une moyenne de 20 fibres observées par MEB
[b] moyenne sur 10 gouttes

Par ailleurs, le **Tableau 3-17** regroupe les mesures de porosimétrie au mercure et d'adsorption d'azote. Les résultats montrent une augmentation de la porosité d'environ 14 % ainsi qu'une gamme de pores interfibres identique entre les matériaux avant et après dégradation. L'augmentation de la porosité peut être expliquée par l'apparition de nanopores au sein des fibres après hydrolyse (**Figure 3-14**). Cette nouvelle porosité génère ainsi une augmentation de la surface spécifique, comme en témoigne les valeurs déterminées par BET.

Tableau3-17 : Caractéristiques de la porosité des matériaux fibreux issus des mélanges PHBHV/PLA.

Matériaux	**Taille de pores [a] (nm)**	**Volume poreux [a] (mL/g)**	**Porosité [a] (%)**	**Aire spé. [b] (m^2/g)**
PHBHV	0,7 – 4	1,7	54	57
PHBHV-PLA (85-15)	0,8 - 2	1,8	54	59
PHBHV-PLA (85-15) hydrolysé	0,8 - 2	2,1	68	66

[a] détermination par porosimétrie au mercure
[b] détermination par adsorption d'azote (méthode BET : 77 °K)

Avec la perspective de moduler la topographie des fibres, nous avons augmenté la quantité d'agent porogène dans le système avec un rapport PHBHV/PLA de 50/50 (m/m). La **Figure 3-15** illustre les images de MEB des matériaux réalisés par « electrospinning » avant et après hydrolyse sélective des chaînes de PLA. Après élimination de l'agent porogène, nous observons la formation de rainures le long de la surface des fibres, orientées parallèlement au sens d'étirement des fibres correspondant à l'orientation des chaînes de PLA.

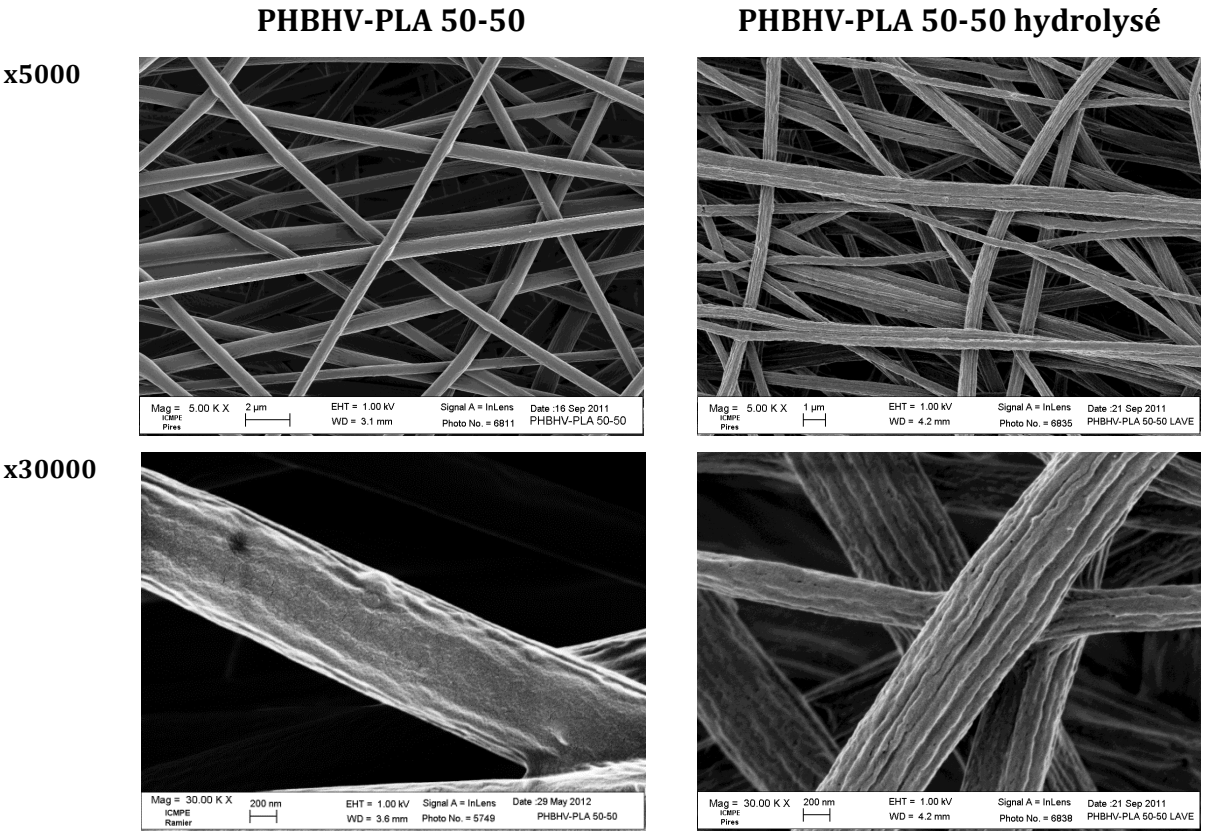


Figure 3-15 : Images de MEB de fibres de PHBHV-PLA (50/50, m/m) avant et après hydrolyse sélective du PLA (45 minutes, T. amb. dans MeOH/H_2O (40/60, v/v) avec 0,1 M de NaOH). Conditions d' « electrospinning » : [polymère] = 15 % (m/v) dans TFE, voltage = 25 kV, débit = 1,5 mL.h^{-1}, distance = 25 cm.

Les fibres rainurées de PHBHV ont été analysées non seulement par MEB mais aussi caractérisées par la goniométrie (**Tableau 3-18**). Tout d'abord, nous pouvons observer la légère diminution du diamètre des fibres de l'ordre de 41 nm après dégradation, ce qui peut être expliqué par la présence de PLA en surface des fibres de PHBHV. D'autre part, le fait que le PHBHV et le PLA soient deux polymères hydrophobes impliquent que les valeurs d'angles de contact mesurées avant et après dégradation ne varient pas et soient de l'ordre de 111°.

Tableau 3-18 : Caractéristiques des matériaux fibreux issus des mélanges PHBHV/PLA.

Matériaux	Diamètre [a] (nm)	Angle de contact [b]
PHBHV	420	107 ° ± 5
PHBHV-PLA (50-50)	627	113 ° ± 6
PHBHV-PLA (50-50) hydrolysé	586	111 ° ± 4
PLA	700	111 ° ± 5

[a] détermination par ImageJ sur une moyenne de 20 fibres observées par MEB
[b] moyenne sur 10 gouttes

Le **Tableau 3-19** regroupe les mesures de porosimétrie au mercure et d'adsorption d'azote. Les résultats indiquent des valeurs de porosité et de taille de pores interfibres identiques entre les matériaux avant et après dégradation. Néanmoins, les valeurs d'aire spécifique déterminées par la méthode de BET montrent une augmentation après hydrolyse du PLA. Cette surface élevée est corrélée avec la topographie de surface des fibres devenues rugueuses après hydrolyse de l'agent porogène (**Figure 3-15**). Par conséquent, il est intéressant de noter qu'une méthode permettant d'augmenter la surface spécifique des fibres sans altérer sa porosité consiste à mélanger deux partenaires immiscibles donnant lieu à des fibres mixtes composées des deux polymères.

Tableau 3-19 : Caractéristiques de la porosité des matériaux fibreux issus des mélanges PHBHV/PLA.

Matériaux	**Taille de pores [a] (nm)**	**Volume d'intrusion [a] (mL/g)**	**Porosité [a] (%)**	**Aire spé. [b] (m^2/g)**
PHBHV	0,7 – 4	1,7	54	57
PHBHV-PLA (50-50)	0,9 - 5	4,7	70	58
PHBHV-PLA (50-50) hydrolysé	0,9 - 5	5,2	70	74

[a] détermination par porosimétrie au mercure
[b] détermination par adsorption d'azote (méthode BET : 77 °K)

3.3. Fonctionnalisation des matériaux fibreux

La technique de l' « electrospinning » a prouvé son efficacité et son adaptabilité dans l'élaboration de structures tridimensionnelles biomimétiques pour l'ingénierie tissulaire.[4] Cependant, un défi majeur consiste en la (bio)fonctionnalisation des matériaux par diverses molécules telles que des protéines, des sucres ou encore des particules minérales afin d'améliorer la prolifération et le développement cellulaire mais aussi pour permettre de guider leur différentiation sur la charpente avant implantation. C'est dans la perspective d'élaborer un matériau non seulement capable de supporter la colonisation cellulaire mais également doté d'une activité biologique que nous avons effectué différentes fonctionnalisations. Ainsi, nous avons étudié plusieurs approches , d'une part, l'association de biocéramique susceptible d'induire une ostéoconductivité ou de gélatine afin de permettre un meilleur développement des

cellules et, d'autre part, la mise en place d'une chimie de surface sur les mats nanofibreux permettant d'introduire des fonctions chimiques susceptibles d'être mobilisées pour améliorer la réponse biologique.

3.3.1. Incorporation d'hydroxyapatite

Dans un premier temps, notre objectif a été d'incorporer des nanoparticules d'hydroxyapatite (nHA) au sein des matériaux fibreux. Il a été montré par divers travaux que cette biocéramique, qui est un composant majeur des os, possède des propriétés d'ostéoinduction et d'ostéoconduction vis-à-vis des cellules à leur contact.[5] Par conséquent, l'introduction de cette fonctionnalité pouvant guider les cellules vers un phénotype ostéoblastique devrait permettre de réaliser un matériau fibreux biofonctionnel dans le cadre de la régénération osseuse.

Dans cette perspective, un matériau composite PHB/nHA nanofibreux a été élaboré par l'addition de 15 % (m/m) de nHA (diamètre < 200 nm) par rapport au PHB concentré à 14 % (m/v) dans un mélange $CHCl_3$/DMF (80/20, v/v). Il est possible d'observer (**Tableau 3-20)** la légère augmentation de la conductivité avec l'ajout des nHA en raison de l'addition d'ions calcium et phosphate.

Tableau 3-20 : Valeurs de viscosité et de conductivité à 25°C d'une solution de PHB/nHA dans un mélange $CHCl_3$/DMF (80/20, v/v)

Polymères	Viscosité (cP)	Conductivité ($\mu S.cm^{-1}$)
PHB 14 % (m/v) +nHA 15 %	640	26,6
PHB 14 % (m/v)	640	23,4

Les fibres composites composées de PHB et de nHA ont été préparées par « electrospinning » avec un voltage de 25 kV, un débit de 3 $mL.h^{-1}$ et une distance aiguille/collecteur de 25 cm. Sur la **Figure 3-16** on remarque la très faible proportion de nanoparticules en surface qui s'explique par leur internalisation au sein des fibres. Ce matériau a été caractérisé de manière approfondie. Les résultats sont présentés dans l'article n°4 (section 4.1).

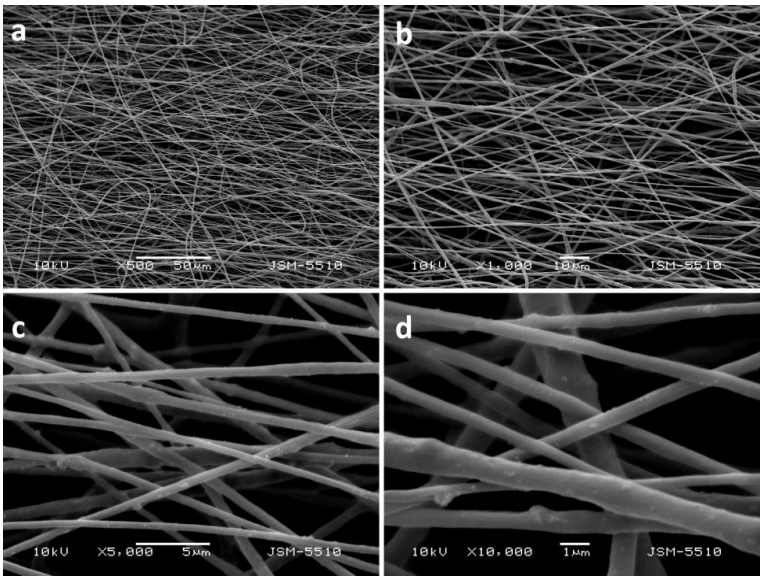


Figure 3-16 : Images de MEB de fibres de PHB/nHA(blend). Conditions d' « electrospinning »: [PHB] = 14 % (m/v) dans $CHCl_3$/DMF (80/20) mélangé avec nHA (15 %, m/m), débit = 3 $mL.h^{-1}$, voltage = 25 kV, distance = 25 cm.

Cependant, le fait que les nanoparticules soient majoritairement dispersées au cœur des fibres induit une réduction de la surface de contact avec les cellules et, par conséquent, peut potentiellement inhiber leur activité biologique. Dans le but de réaliser une structure tridimensionnelle biocomposite homogène et biologiquement active, il a été mis au point un couplage de deux techniques : l' « electrospinning » et l' « electrospraying » (déposition de gouttelettes chargées électriquement contenant des particules en suspension) (**(Figure 3-17)**. Le principe consiste en l' « electrospinning » de la solution de polymère, et dans le même temps, l' « electrospraying » des nanopatricules d'hydroxyapatite afin qu'elles se déposent à la surface des fibres simultanément à leur formation.

Figure 3-17: Photo du montage « electrospinning-electrospraying ».

Les conditions optimales d' « electrospraying » ont d'abord été déterminées par l'étude de l'influence de la distance aiguille-collecteur sur le dépôt des nanoparticules à partir d'une suspension de nHA dans l'éthanol à 4 % (m/v) avec un débit de 2 $mL.h^{-1}$ et un voltage de 25 kV. L' « electrospinning » s'effectue à partir d'une solution à 14 % (m/v) dans un mélange $CHCl_3$/DMF (80/20) en appliquant les conditions précédemment décrites. La morphologie des fibres est présentée dans la **Figure 3-18.** Tout d'abord, nous pouvons observer que le champ électrostatique de l' « electrospraying » situé de l'autre coté du collecteur ne perturbe pas la formation des fibres de PHB. Par ailleurs, grâce aux clichés à fort grossissement, il apparaît que le dépôt des nanoparticules est plus efficace en plaçant l'aiguille à 5 cm du collecteur qui permet une meilleure dispersion de l'hydroxyapatite à la surface des fibres.

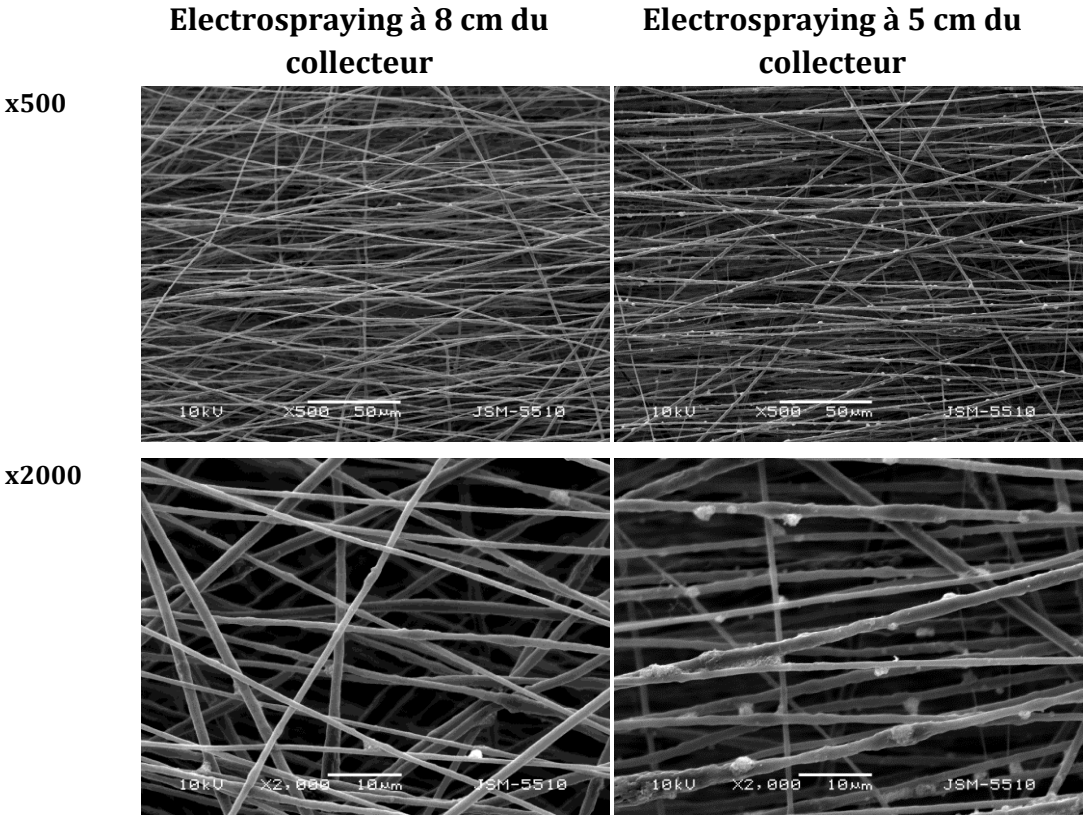


Figure 3-18 : Images de MEB de fibres composites PHB/nHA (spray).
Conditions d' « electrospinning » : [PHB] = 14 % (m/v) dans un mélange $CHCl_3$/DMF, voltage = 25 kV, débit = 3 $mL.h^{-1}$, distance = 25 cm.
Conditions d' « electrospraying » : [nHA] = 4 % (m/v) dans EtOH, voltage = 25 kV, débit = 2 $mL.h^{-1}$.

Cependant, lors de l'electrospraying d'une solution à 4 % (m/v) la quantité d'hydroxyapatite déposée à la surface des fibres reste faible. Afin de réaliser un matériau constitué de fibres recouvertes en plus grande quantité de biocéramiques, la concentration de la suspension de nHA a été augmentée à 10 % (m/v) tout en maintenant la distance aiguille-collecteur égale à 5 cm. Comme attendu, l'utilisation d'une plus forte concentration assure une plus grande incorporation de nanoparticules au sein du matériau fibreux. Les images de MEB à fort grossissement (x5000) de la **Figure 3-19** montrent clairement la présence de particules de nHA en quantité significative autour des fibres générant ainsi une surface potentiellement active biologiquement. Les caractérisations de ce matériau composite seront illustrées et discutées en détails dans la publication n°4 (section 4.1).

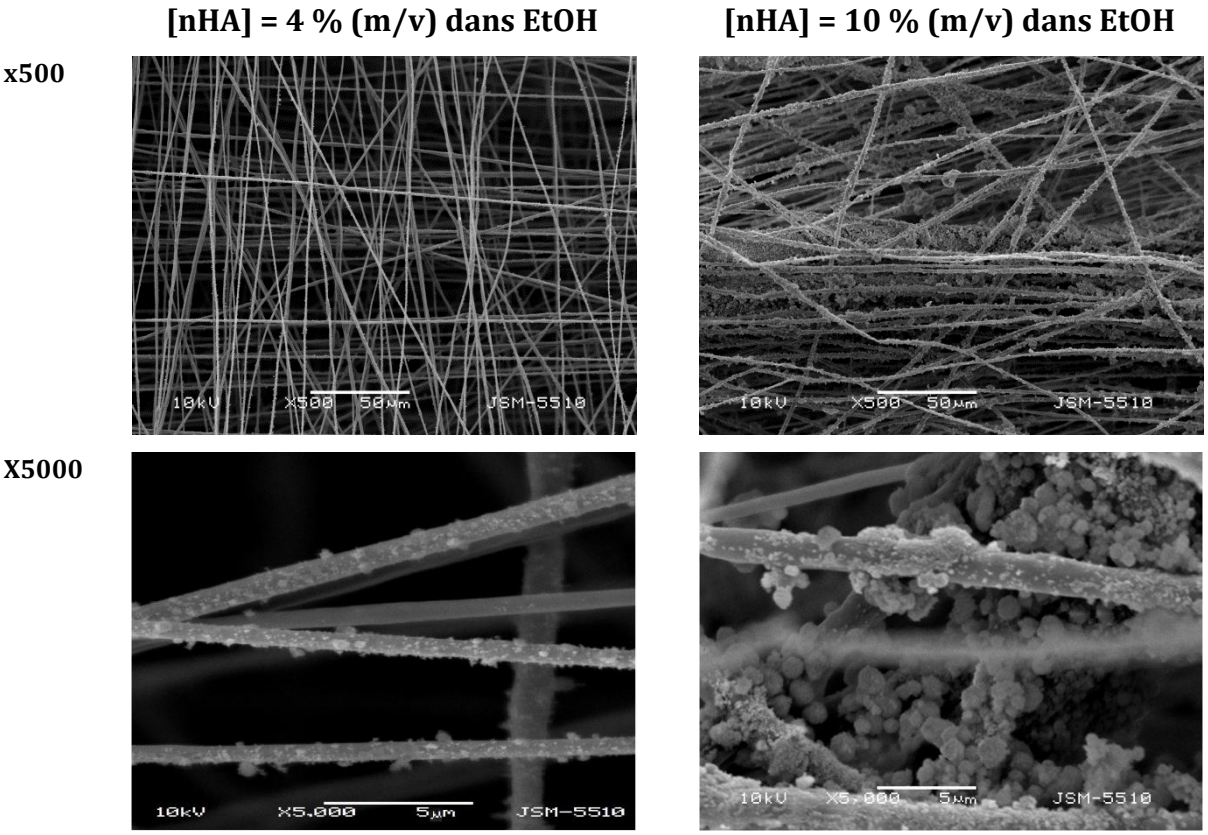


Figure 3-19 : Images de MEB de fibres composites PHB/nHA (spray).
Conditions d' « electrospinning »: [PHB] = 14 % (m/v) dans un mélange $CHCl_3$/DMF, voltage = 25 kV, débit = 3 mL.h^{-1}, distance = 25 cm.
Conditions d'« electrospraying »: voltage = 25 kV, débit = 2 mL.h^{-1}, distance = 5 cm.

3.3.2. Incorporation de gélatine

La fonctionnalisation de biomatériaux destinés à la culture de cellules peut également consister à réaliser une structure mimant la composition chimique de la matrice extracellulaire. Par conséquent, nous avons envisagé d'incorporer un biopolymère naturel tel que la gélatine (GEL) afin de fournir aux cellules un environnement favorable à leur prolifération et leur différentiation. L'addition de gélatine permet de générer sur le matériau hôte des sites de liaisons avec les intégrines de la membrane cellulaire améliorant ainsi l'adhérence et la colonisation des cellules sur le biomatériau.

La **Figure 3-20** présente les images de MEB de matériaux nanofibreux à base de gélatine réalisés par les techniques d' « electrospinning » et de couplage « electrospinning-electrospraying ». De plus, certains matériaux offrent une double fonctionnalisation par l'addition d'hydroxyapatite impliquée dans la différentiation ostéoblastique. Il est important de préciser que l'incorporation d'hydroxyapatite est à nouveau réalisée en comparant la méthode d' « electrospinning » d'une suspension de nanoparticules dans une solution de PHB (PHB/GEL/nHA(blend)) et la méthode d' « electrospraying » d'une suspension de nanoparticules couplée à l' « electrospinning » d'une solution de PHB et GEL (PHB/GEL/nHA(spray)).

Les conditions expérimentales sont résumées ci-dessous :

- Pour le matériau i) : [PHB/GEL] = 10 % (m/v) dans le TFE avec un rapport PHB/GEL de 75/25 (m/m), voltage 25 kV, débit = 1 $mL.h^{-1}$, distance = 25 cm.
- Pour le matériau ii) : [PHB/GEL] = 10 % (m/v) dans le TFE avec des rapports PHB/GEL de 75/25 (m/m) et PHB/GEL/nHA de 75/25/20 (m/m/m), voltage 25 kV, débit = 1 $mL.h^{-1}$, distance = 25 cm.
- Pour le matériau iii) : [PHB/GEL] = 10 % (m/v) dans le TFE avec un rapport PHB/GEL de 75/25 (m/m), voltage 25 kV, débit = 1 $mL.h^{-1}$, distance = 25 cm. « Electrospraying»: [nHA] = 10 % (m/v) dans EtOH, voltage = 25 kV, débit = 2 $mL.h^{-1}$, distance = 5 cm.

Les fibres à base de gélatine illustrées par les images de MEB de la **Figure 3-20** sont caractérisées par un diamètre compris entre 480 nm et 491 nm. D'autre part, la structure du matériau est homogène, puisqu'il est constitué de fibres indépendantes, lisses et sans défaut. Comme précédemment décrit dans la partie 3.3.1, la quantité d'hydroxyapatite en surface des fibres pour le matériau ii) est faible alors que le matériau nanofibreux iii) élaboré par le couplage « electropinning-electrospraying » est composé de fibres recouvertes de nanoparticules mais aussi pour certaines piégées au sein d'agglomérats d'hydroxyapatite. Les

analyses détaillées des matériaux composites à base de gélatine et d'hydroxyapatite sont rapportées dans la section 4.2.

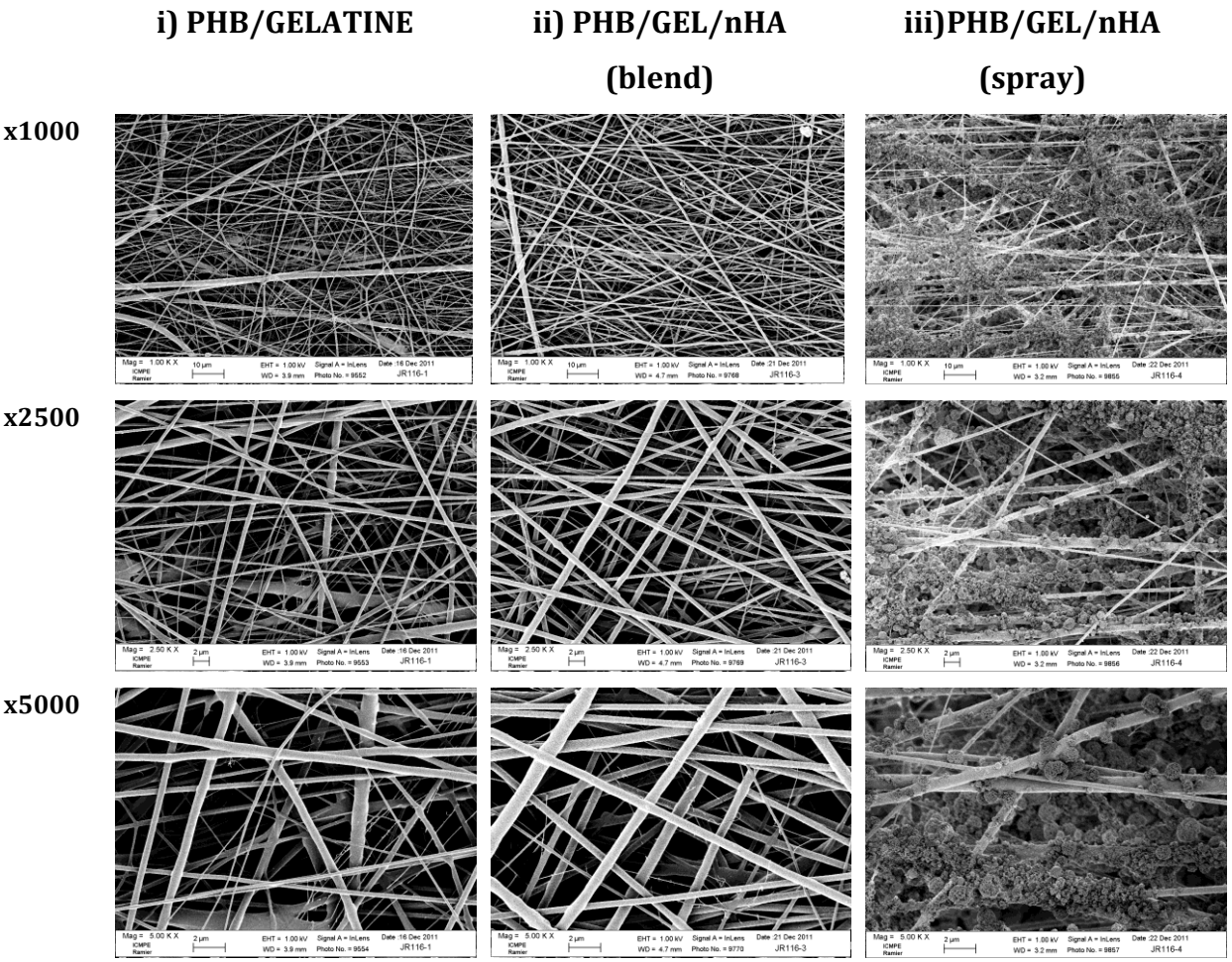


Figure 3- 20 : Images de MEB de fibres composites PHB/GEL, PHB/GEL/nHA (blend) et PHB/GEL/nHA (spray).

3.3.3. Greffage de molécules par addition thiol-ène

Au cours de ces dernières années, la fonctionnalisation de fibres de polymère destinées à des applications dans le domaine de l'ingénierie tissulaire a été essentiellement réalisée par « coating », « co-electrospinning » ou encore par traitement plasma. Cependant, il existe très peu de travaux relatifs au greffage covalent de protéines ou d'autres (bio)molécules capables de générer une activité biologique. Dans cette optique, nous avons réalisé une fonctionnalisation par chimie « click » sur des fibres de polyesters biosourcés portant une fonction alcène sur leur chaîne latérale. La réaction de thiol-ène addition de l'acide mercaptosuccinique effectuée sous

UV introduit des fonctions acide carboxylique capables d'être mobilisées pour le greffage de protéines (**Schéma 3-1)**.

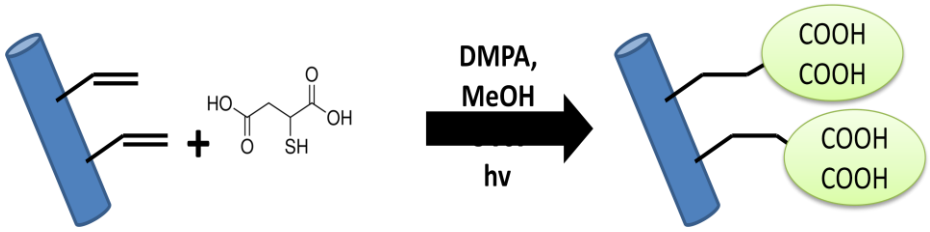


Schéma 3-1 : Schéma réactionnel d'une réaction de thiol-ène addition d'acide mercaptosuccinique sur des fibres de PHBHHx/PHOU sous irradiation UV.

La fonction alcène mobilisée lors de l'addition thiol-ène est apportée par le PHOU qui contient 31 % de motifs insaturés (double liaison en position terminale de la chaîne latérale du motif) (**Figure 3-21**). Cependant, ce polyester est caractérisé par une T_g de l'ordre de -40 °C et un faible taux de cristallinité rendant impossible l'obtention d'une structure fibreuse stable. Il est alors nécessaire de réaliser l' « electrospinning » de ce polymère en présence d'un partenaire plus cristallin tel que le PHBHHx apportant une rigidité qui stabilisera la morphologie du matériau. Le choix d'associer le PHOU avec le PHBHHx et non le PHBHV, repose sur la présence d'unités monomères communes au PHOU à savoir le 3-hydroxyhexanoate. Cette similitude devrait apporter une meilleure miscibilité entre les deux polymères.

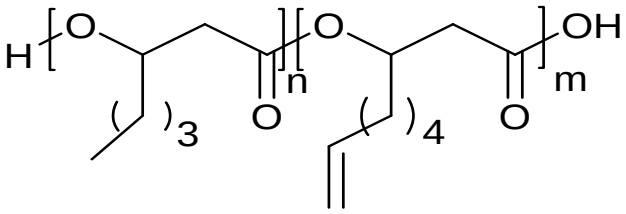


Figure 3-21 : Formule chimique du PHOU.

L' « electrospinning » d'une solution à 10 % (m/v) de mélanges de PHBHHx/PHOU (75/25 et 50/50, m/m) dans le TFE a permis d'obtenir les matériaux fibreux illustrés par les images de MEB de la **Figure 3-22**. Les clichés à faible grossissement (x2500) montrent une structure homogène composée de fibres sans défaut de l'ordre de 1 ± 0,1 µm et 0,9 ± 0,3 µm pour les matériaux constitués d'un rapport PHBHHx/PHOU de 75/25 (m/m) et 50/50 (m/m). En outre, nous pouvons remarquer que dans le cas du matériau contenant la plus forte

proportion de PHOU, les fibres ont tendance à se coller pour former d'importantes jonctions au niveau de leurs croisements en raison du comportement élastomère de ce polyester. De plus, la formation de fibres très fines entraîne une plus grande polydispersité de leur diamètre. Les clichés à plus fort grossissement (x10000) permettent d'observer plus précisément ces fibres fines reliant entre elles les fibres de diamètre plus important. Par ailleurs, il est important de préciser que l'élaboration de matériaux constitués d'une proportion en PHOU plus élevée conduit la formation de fibres structuralement instables.

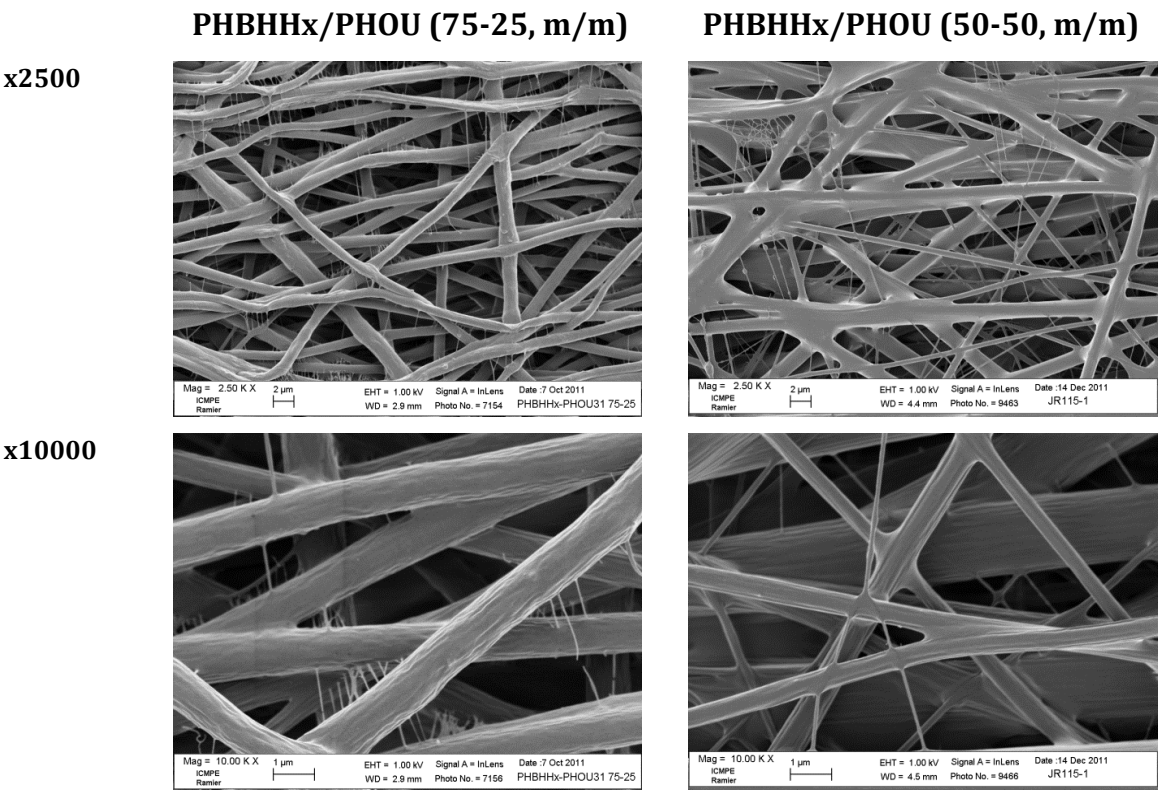


Figure 3- 22 : Images de MEB de fibres de PHBHHx/PHOU.
Conditions d' « electrospinning »: [Polymères] = 10 % (m/v) dans un TFE, voltage = 25 kV, débit = 1,5 mL.h^{-1}, distance = 25 cm.

Les fonctions alcène des matériaux peuvent être mises en évidence par spectroscopie IRTF (**Figure 3-23)**. Le suivi de la réaction d'addition thiol-ène peut se faire aisément via la disparition de la bande à 1641 cm^{-1} caractéristique de la fonction alcène du PHOU.

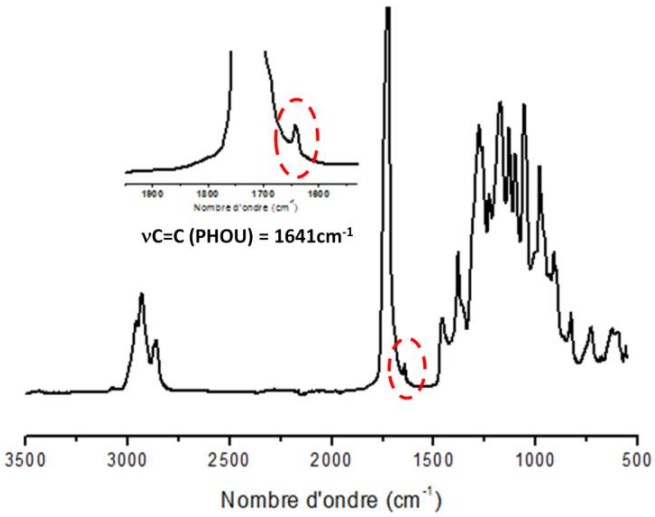


Figure 3-23 : Spectre IRTF de fibres de PHBHHx-PHOU (50-50, m/m).

La réaction de thiol-ène addition est réalisée dans 2 mL de MeOH additionnés d'acide mercaptosuccinique à la concentration de 1 M et de DMPA comme photoamorceur à 10 % (m/m) par rapport à la fonction thiol. L'influence de la durée d'irradiation est suivie par IRTF. Les résultats montrent que dès la première minute d'irradiation la bande de vibration de la double liaison disparaît complètement (**Figure 3-24**). De plus, l'apparition d'une bande large caractéristique des fonctions acide carboxylique entre 3300 et 2800 cm^{-1} est présente sur tous les spectres attestant d'un greffage covalent de l'acide mercaptosuccinique.

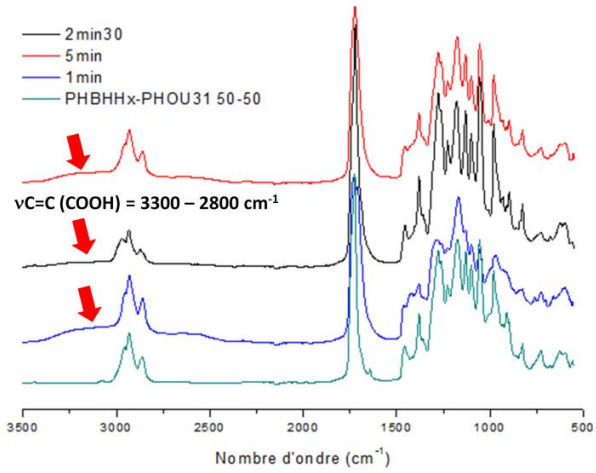


Figure 3-24 : Spectres IRTF des matériaux fibreux après addition thiol-ène de l'acide mercaptosuccinique avec différents temps d'irradiation UV ([acide mercaptosuccinique] = 1 M, [DMPA] = 10 % (m/m).

Dans la volonté d'apporter des éléments supplémentaires établissant un couplage covalent, les matériaux ont été analysés par spectrométrie des rayons X à énergie dispersive (EDX). Comme attendu, seuls deux éléments, carbone et oxygène, sont présents sur les fibres générées par « electrospinning » (**Figure 3-25**) (le platine est issu de la métallisation des échantillons avant l'analyse de MEB). Après la réaction d'addition thiol-ène, l'analyse par EDX des fibres révèle l'apparition d'un pic attribué à l'élément soufre résultant du greffage de l'acide mercaptosuccinique. La disparition de la fonction alcène, associée à l'apparition de la bande de vibration des fonctions acide carboxylique mise en évidence par IRTF, et de la présence du soufre par EDX, apportent la preuve du greffage covalent par addition thiol-ène.

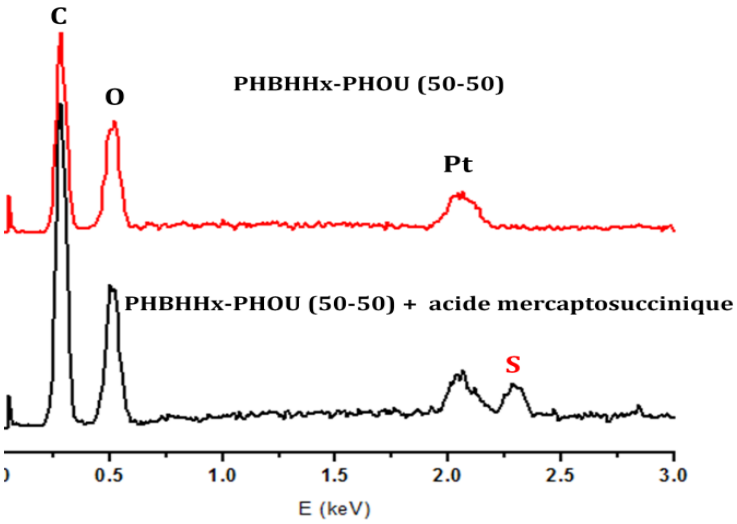


Figure 3-25 : Analyse par EDX de matériaux fibreux à base de PHBHHx/PHOU avant et après thiol-ène addition de l'acide mercaptosuccinique (durée d'irradiation UV = 1 minute, [acide mercaptosuccinique] = 1 M, [DMPA] = 10 % (m/m)).

Par ailleurs, il est important de s'assurer que le procédé ne dégrade pas la structure du matériau ni la morphologie des fibres. Les clichés de MEB à faible grossissement (x2500) atteste que la structure des matériaux demeure fibreuse cependant les clichés à fort grossissement (x10000) montrent l'apparition de fissures le long des fibres ayant été exposées à une irradiation de 2min30, laissant transparaître une dégradation lors d'une trop longue exposition (**Figure 3-26).** Les fibres irradiées pendant une minute ne présentent pas de tels dommages et le diamètre de l'ordre de 870 ± 210 nm, reste voisin de celui mesuré avant la fonctionnalisation.

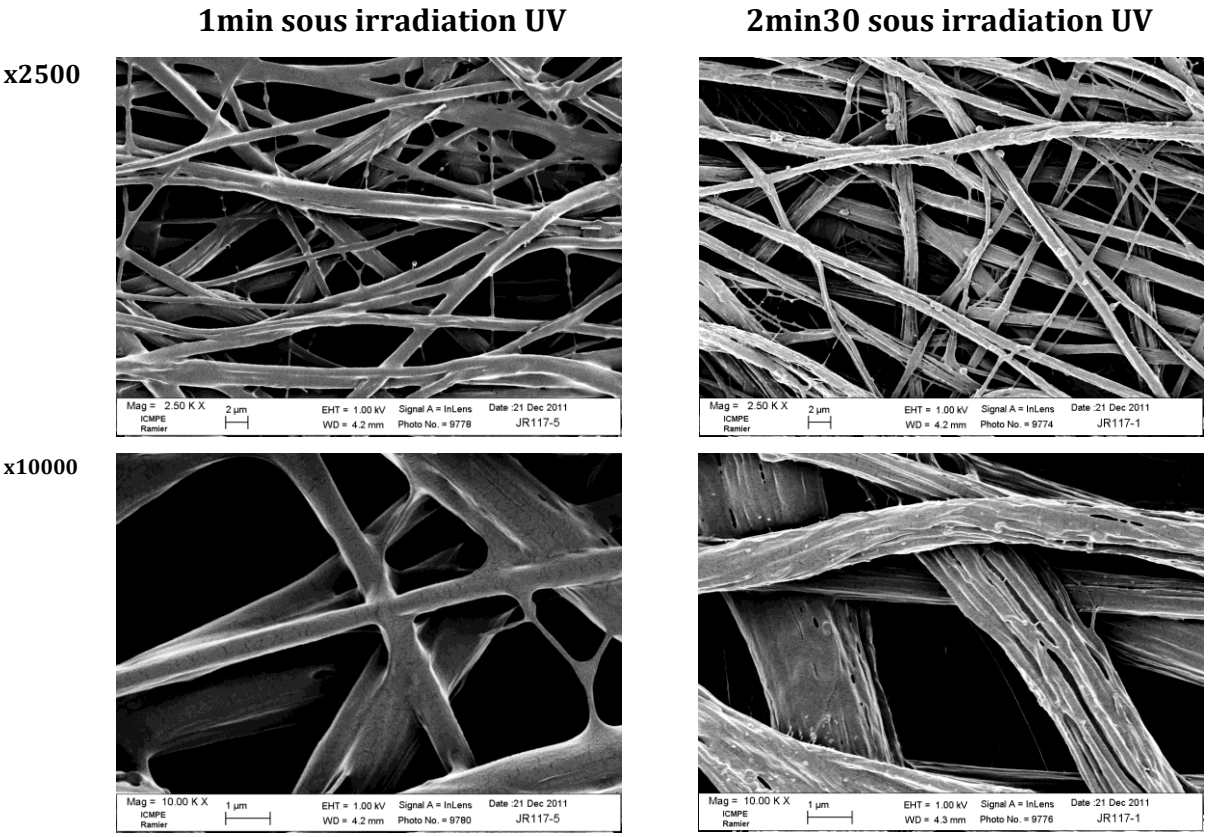


Figure 3-26 : Images de MEB de fibres de PHBHHx/PHOU (50/50, m/m) après la réaction de thiol-ène ([acide mercaptosuccinique] = 1 M, [DMPA] = 10 % (m/m)).

Le procédé a été transposé à d'autres molécules comme le L-glutathion et la cystéine, avec le même succès, ce qui contribue à mettre en exergue l'efficacité reconnue des réactions de chimie « click » qui permettent de fonctionnaliser de manière relativement aisée la surface de mats nanofibreux de PHAs. La fonctionnalisation par insertion de fonctions acide carboxylique rend envisageable la maîtrise de la chimie de surface de motifs d'adhésion (peptides RGD), de molécules ostéogéniques et angiogéniques (BMP, TGF, VEGF) qui pourront par la suite être greffés à leur surface, de façon covalente ou par des liaisons faibles.

3.3.4. Fonctionnalisation par introduction de fonctions époxyde

L'introduction de fonctions époxyde a été envisagée via deux approches : soit en utilisant un PHA préalablement modifié et porteur de fonctions époxyde en position latérale, soit en introduisant les fonctions époxyde par un procédé de greffage par polymérisation du méthacrylate de glycidyle (GMA).

- Elaboration de fibres de PHBHHx/PHOU avec époxydation de la double liaison avant « electrospinning »

Bear *et al.*[6] ont décrit la réaction d'époxydation des doubles liaisons du PHOU par l'acide *m*-chloroperbenzoique en solution. Afin de réaliser une matrice par « electrospinning », le PHOU époxydé, noté PHOep, a été mélangé avec du PHBHHx, plus cristallin. L'élaboration de matrices à base de PHOep (T_g = -36 °C, T_m = 42 °C) a été étudiée dans un premier temps avec deux compositions : 75/25 et 50/50 (m/m). Les caractérisations effectuées par MEB (**Figure 3-27**) permettent d'observer la structure fibreuse homogène du matériau contenant 25 % de PHOep avec un diamètre de fibres de l'ordre de 980 ± 90 nm. Cependant, le matériau élaboré à partir d'un mélange contenant 50 % en masse de polyester perd son aspect fibreux et forme un film résultant de la tendance des fibres à se coller entre elles. Dans l'optique de garder un support tridimensionnel, la suite de l'étude sera effectuée avec un matériau composé de 25 % en PHOep.

PHBHHx/PHOep (75/25, m/m) **PHBHHx/PHOep (50/50, m/m)**

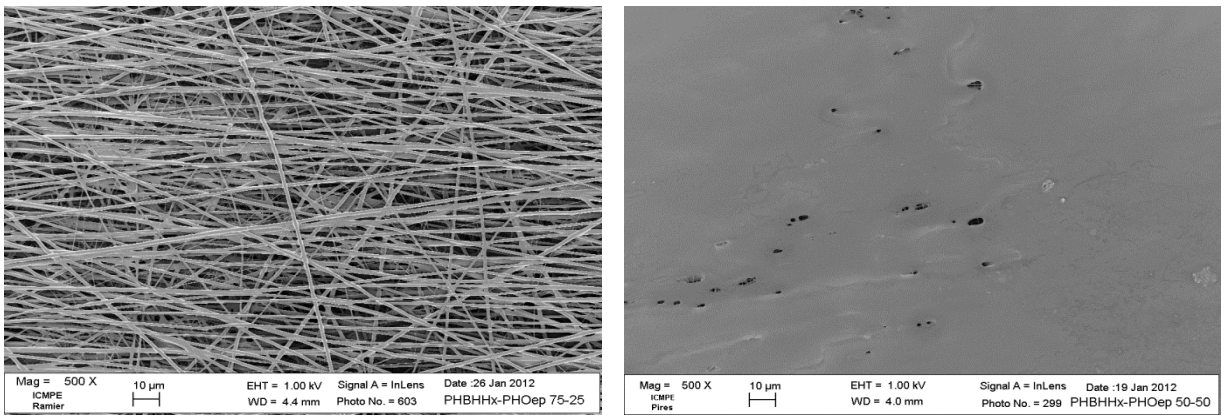


Figure 3-27 : Images de MEB de fibres de PHBHHx/PHOep. Conditions d'electrospinning : [polymères] = 10 % (m/v) dans TFE, voltage = 25 kV, débit = 1,5 mL.h^{-1}, distance = 25 cm.

La cytotoxicité des fonctions époxyde a été évaluée par des études d'adhésion et de prolifération de cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSCs) sur les matériaux élaborés. La **Figure 3-28A** permet d'observer l'adhésion des cellules après 1 h. Sur les 40 000 cellules ensemencées, environ 30 000 cellules ont adhéré aux matrices, soit environ 75 %. Pour ce premier test, nous pouvons remarquer que les fonctions, soit alcène pour le PHOU, soit époxyde pour le PHOep, n'induisent pas de toxicité supplémentaire vis-à-vis des hMSCs après une heure de culture. Dans un second temps, la prolifération (**Figure 3-28B**), où 20 000 cellules ont été ensemencées, confirme le caractère non cytotoxique des matériaux avec une croissance cellulaire en augmentation constante. En effet, l'augmentation du nombre de cellules sur les matrices fibreuses entre le jour 2 et le jour 5 est de l'ordre de 170 %, ce qui est comparable à celui du TCP (Tissu Culture Plate, puits de polystyrène traités pour que 100 % des cellules adhèrent) à savoir 161 %.

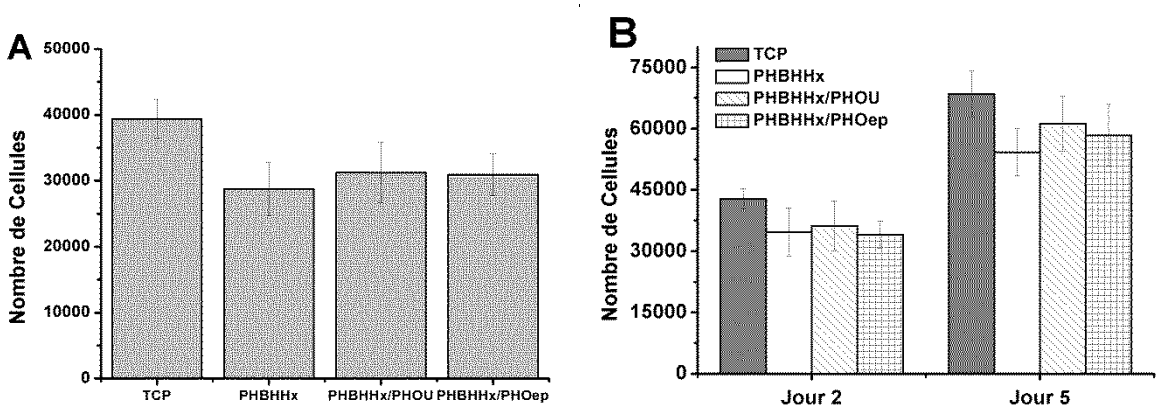


Figure 3-28 : (A) Adhésion et (B) prolifération des hMSCs sur les matrices fibreuses à base de PHBHHx, de PHOU et de PHOep.

La forme étalée des cellules sur les matériaux fibreux confirme le caractère non cytotoxique des époxydes et des fonctions alcène (**Figure 3-29).** Cette morphologie cellulaire révèle une certaine affinité avec les matériaux. Au 5ème jour de culture, les hMSCs commencent à se connecter les unes avec les autres afin de permettre un échange de divers informations et signaux. Celles-ci vont alors proliférer et coloniser l'ensemble de la surface disponible jusqu'à la confluence. L'observation sur les images de MEB du développement des hMSCs permet de confirmer les propriétés adéquates de ces matrices à être utiliser comme supports de prolifération cellulaire.

PHBHHx/PHOU (75/25, m/m) **PHBHHx/PHOep (75/25, m/m)**

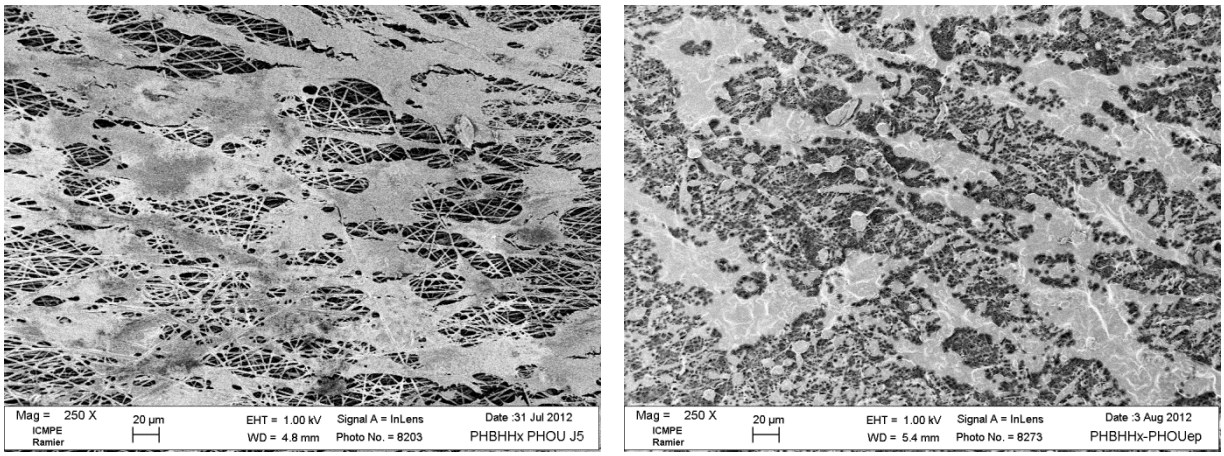


Figure 3-29 : Images de MEB des hMSCs après 5 jours de culture sur des mats de PHBHHx/PHOU et PHBHHx/PHOep.

➢ Fonctionnalisation de fibres de PHBHV par la méthode « grafting from »

La modification envisagée a été réalisée selon le procédé du « grafting from ». Au cours de cette étude, les greffages direct (sans activation de surface préalable) et indirect (avec activation de surface préalable avec un photoamorceur) par irradiation UV ont été expérimentés en présence d'un amorceur photochimique, la benzophénone (BP).

Quatre méthodes différentes ont été expérimentées (**Figure 3-30**):

- greffage sans solvant (méthode A) : un carré de 1,5x1,5 cm de PHBHV est immergé pendant une nuit dans une solution de [BP] (0,5 M) et de [GMA] (3,7 M) dans le MeOH. Le mat est ensuite extrait et irradié à une distance de 11 cm à une intensité de 100 %.
- greffage en présence d'une solution de monomère (méthode B) : une solution de [BP] (0,5 M) dans le MeOH est préparée et un carré de 1,5x1,5 cm de PHBHV est immergé pendant une nuit dans cette solution. Le mat est ensuite extrait et irradié à une distance de 11 cm à une intensité de 100 %. Lors d'une deuxième étape, le mat est recouvert par 2 mL d'une solution de GMA (3,7 M dans du MeOH, préalablement dégazée) et irradié.
- greffage en milieu confiné en 2 étapes (méthode C) : le protocole est le même que celui de la méthode B à la différence de la seconde irradiation au cours de laquelle le mat est placé en milieu confiné entre deux lamelles de quartz.
- greffage en milieu confiné en 1 étape (méthode D) : le protocole est similaire à celui de la méthode A mais lors de l'étape d'irradiation, le mat est placé en milieu confiné entre deux lamelles de quartz.

Les quatre procédés de greffage ont été soumis au même protocole d'extraction : les mats sont extraits 3 fois par 30mL de dioxane (1heure) sous agitation afin d'éliminer le PGMA puis extraits dans l'éthanol (1 fois par 30 mL, 1h30) pour extraire la benzophénone résiduelle. Après évaporation sous vide, les mats sont pesés afin de pouvoir calculer le taux de greffage.

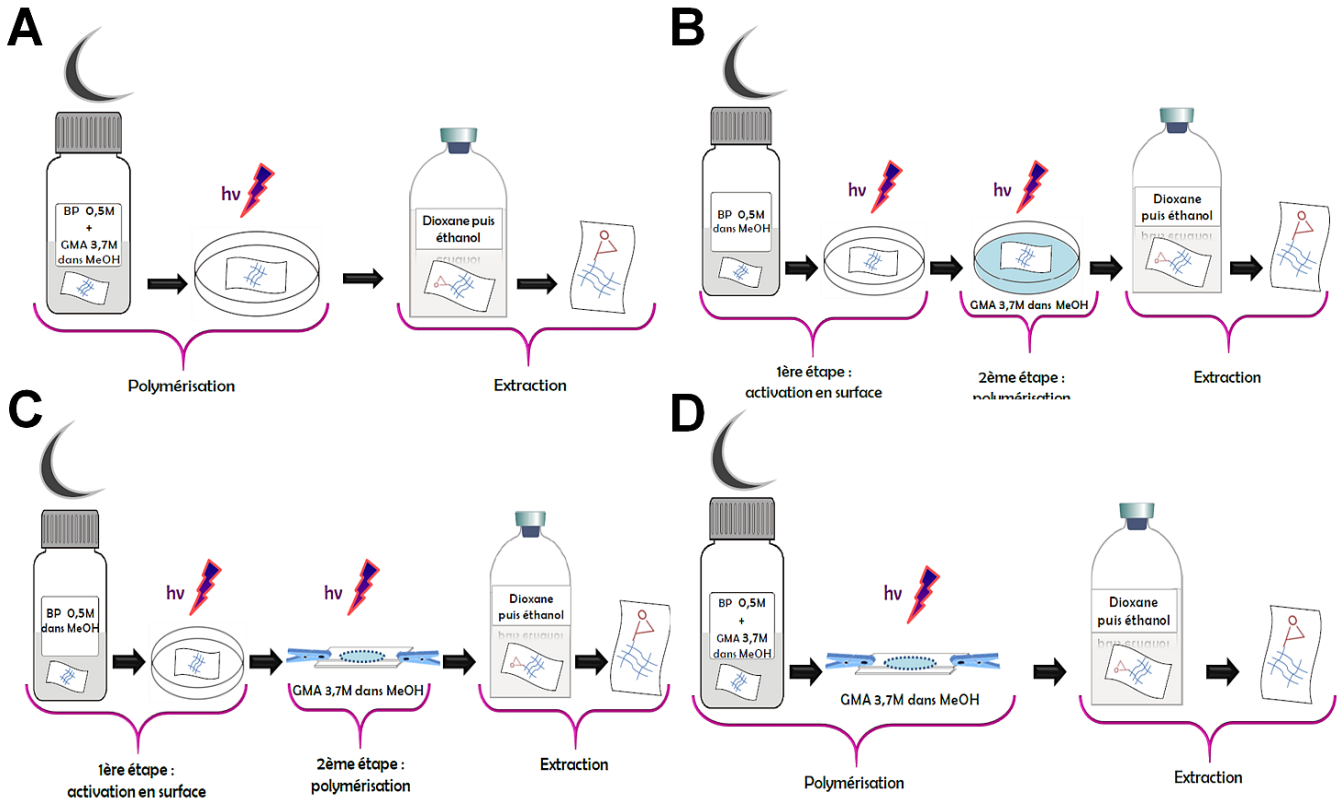


Figure 3-30 : Représentations des protocoles expérimentés de greffage A) méthode A, B) méthode B, C) Méthode C et D) Méthode D.

Les échantillons sont analysés par spectroscopie IRTF. Afin de déterminer la bande qui attestera de la réussite du greffage, tous les spectres présentés ont été normalisés par rapport à la bande du carbonyle de l'ester à 1720 cm^{-1}.

La **Figure 3-31** représente la superposition des spectres IRTF du PHBHV (en vert) et du PGMA (en rose). La bande à 1720 cm^{-1} correspondant aux carbonyles est caractéristique du PHBHV ainsi que du PGMA. Une bande à 759 cm^{-1} appartenant uniquement au PGMA correspond à la liaison C-O de l'époxyde. Cependant, il existe d'autres bandes caractéristiques des époxydes à 844 cm^{-1} (bande C-O de déformation), et à 1240 cm^{-1} (bande d'élongation de la liaison C-O).

La bande à 759 cm^{-1} sera retenue pour attester de l'efficacité du greffage sur les échantillons étudiés.

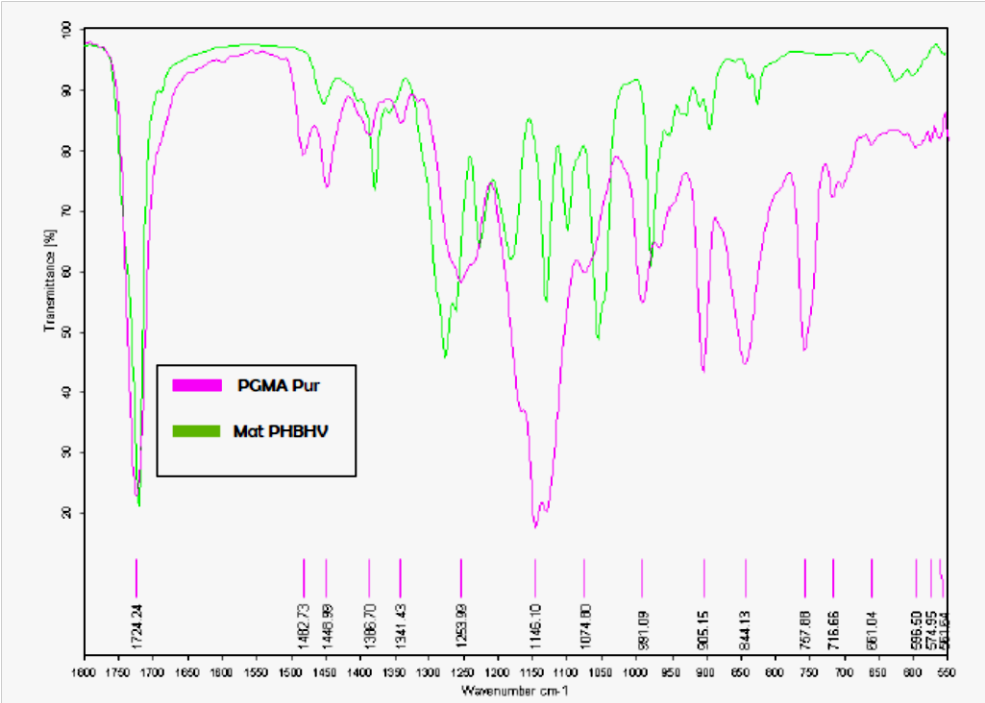


Figure 3-31 : Spectres IRTF du PGMA pur et d'un mat de PHBHV natif.

Le rapport entre la bande constante à 1720 cm^{-1} et la bande de l'époxyde, noté : I_{759}/I_{1720}., permet de rendre compte de l'importance du greffage. La valeur numérique du rapport I_{759}/I_{1720} n'a pas été corrélée à une valeur quantitative du taux de greffage. Cependant, cette analyse constitue un moyen rapide pour mettre en évidence l'effectivité du greffage ainsi que son intensité relative. En effet, un taux de greffage élevé est corrélé à une valeur élevée du rapport de bande I_{759}/I_{1720}.

La benzophénone présente également une bande à 759 cm^{-1} pouvant gêner l'interprétation des résultats car elle peut être confondue avec la bande caractéristique du GMA. C'est pourquoi, après irradiation, la benzophénone doit être intégralement éliminée lors d'une étape d'extraction par l'éthanol. Dans l'optique d'obtenir une méthode d'extraction efficace, un mat est imprégné dans une solution de BP à 0,5 M pendant une nuit et irradié 300s sans extraction préalable. Le spectre montre clairement la présence de la bande à 759 cm^{-1}. Après extraction à l'éthanol, le signal à 759 cm^{-1} a totalement disparu. Il n'y a donc plus d'ambiguïté quant à la possibilité de résidus de BP.

Afin de mettre au point et optimiser un protocole en vue du greffage de fonctions époxyde sur des mats de PHBHV, l'influence des paramètres tels que la concentration en

monomère, le procédé et la méthode de greffage ainsi que la durée d'irradiation a été étudiée. Dans un premier temps, les quatre types de procédés ont été comparés. Les valeurs des taux de greffage calculés pour les méthodes A et B sont inférieurs à 1 %, ce qui traduit l'absence de polymérisation de GMA à partir de la surface des fibres. Néanmoins, les taux de greffage calculés pour les tests réalisés en milieu confiné C et D, respectivement de 55 % et 20 %, témoignent dans ce cas d'un greffage effectif. La technique du milieu confiné a l'intérêt de favoriser les réactions où l'oxygène interfère avec le mécanisme de polymérisation et assure un contact étroit entre la solution hydrophile et le mat hydrophobe. D'autre part, les différences notables entre la méthode C et la méthode D résident dans les taux de greffage et la qualité des mats après irradiation. L'efficacité du greffage plus élevé obtenu avec la méthode C, peut s'expliquer par un nombre de radicaux en surface plus élevé, générés lors de la première étape d'activation. Dans la méthode D, l'activation de la surface se fait simultanément à la polymérisation du GMA et ceci dans le même intervalle de temps à savoir 300 secondes. Bien que la méthode D conduise à un taux de greffage inférieur à celui de la méthode C, tout en restant satisfaisant (20%), cette méthode présente l'avantage indéniable de ne nécessiter qu'une seule étape. La méthode D sera donc retenue comme la méthode de greffage optimal.

Deux concentrations en monomère ont été testées : 1 M et 3,7 M. Les taux de greffage déterminés par gravimétrie ont révélé des valeurs respectives de 1 % et 20 % pour une durée d'irradiation de 300s. Ces résultats ont été également confirmés par une valeur de rapport de bande I_{759}/I_{1720} supérieure pour la solution à 3,7 M (0,0628) comparé à la solution à 1 M (0,0411). Comme attendu, l'augmentation de la concentration en monomère conduit à un greffage significativement plus élevé. La concentration optimale retenue pour le monomère correspond donc à 3,7 M.

La polymérisation photochimique radicalaire est une réaction rapide. Une étude cinétique a été réalisée et illustrée par la **Figure 3-32**. Chaque point a fait l'objet de trois expériences. Comme attendu, le taux de greffage et le rapport de bande I_{759}/I_{1720} montrent une même tendance. La **Figure 3-32** montre que le taux de greffage ainsi que le rapport de bande croissent avec le temps d'irradiation jusqu'à 300 s. La différence observée pour une durée d'irradiation de 400 s peut s'expliquer par la difficulté à séparer l'échantillon de la lamelle de quartz, conduisant au déchirement du mat et à la perte de petits fragments d'échantillon. Il est important de souligner que l'analyse en spectroscopie IRTF, réalisée à différents endroits du mat, indique des valeurs semblables pour le rapport I_{759}/I_{1720}, ce qui permet de postuler que le greffage est relativement homogène en surface. L'étude cinétique montre que la variation de la durée d'irradiation permet de moduler très facilement le taux de greffage et donnera à terme la possibilité d'avoir des échantillons avec des taux de fonctions réactives différents.

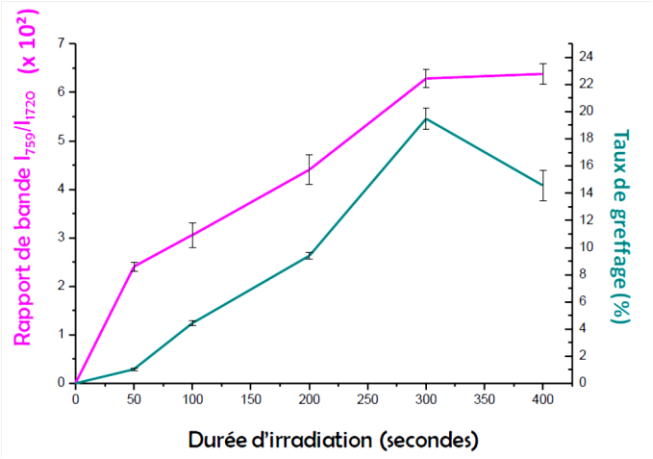


Figure 3-32 : Cinétique de greffage du GMA sur des mats de PHBHV. Méthode D, [GMA] = 3,7 M, [Benzophenone] = 0,5 M.

La présence de fonctions époxyde en surface permet d'envisager une fonctionnalisation ciblée des supports réalisés. Cette fonctionnalisation est intéressante en raison de sa relative stabilité tout en restant réactive dans des milieux peu agressifs puisque des réactions en milieu aqueux peuvent être envisagées. La fonction époxyde peut réagir avec un nucléophile tel qu'un dérivé aminé et permettre d'introduire d'autres fonctions réactives comme l'illustre la **Figure 3-33** ci-dessous :

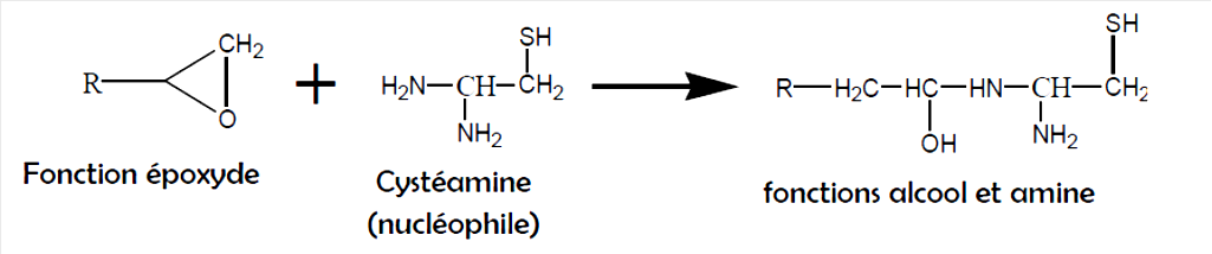


Figure 3-33 : Schéma réactionnel d'une réaction de condensation entre une amine et un époxyde

La faisabilité de cette réaction en solution organique a été testée, dans le méthanol avec la cystéamine, la propargylamine et l'allylamine avant de pouvoir ultérieurement la transposer en solution aqueuse pour des molécules bioactives ou des protéines. Le spectre IRTF des mats traités avec les molécules aminées montrent une diminution de l'intensité voire la disparition de la bande caractéristique de la fonction époxyde à 759 cm^{-1}, ce qui atteste de l'ouverture des fonctions époxyde. D'autre part, dans le cas de la cystéamine, la déformation de la bande centrée

à 759 cm^{-1} qui devient plus étroite et centrée vers 749 cm^{-1} (**Figure 3-34**) peut être attribuée à la liaison carbone-soufre de la cystéamine. En revanche, la liaison alcyne (vers 2260-2100 cm^{-1}) de la propargylamine et la liaison alcène de l'allylamine (1640 cm^{-1}) n'ont pas pu être mise en évidence par spectroscopie IRTF.

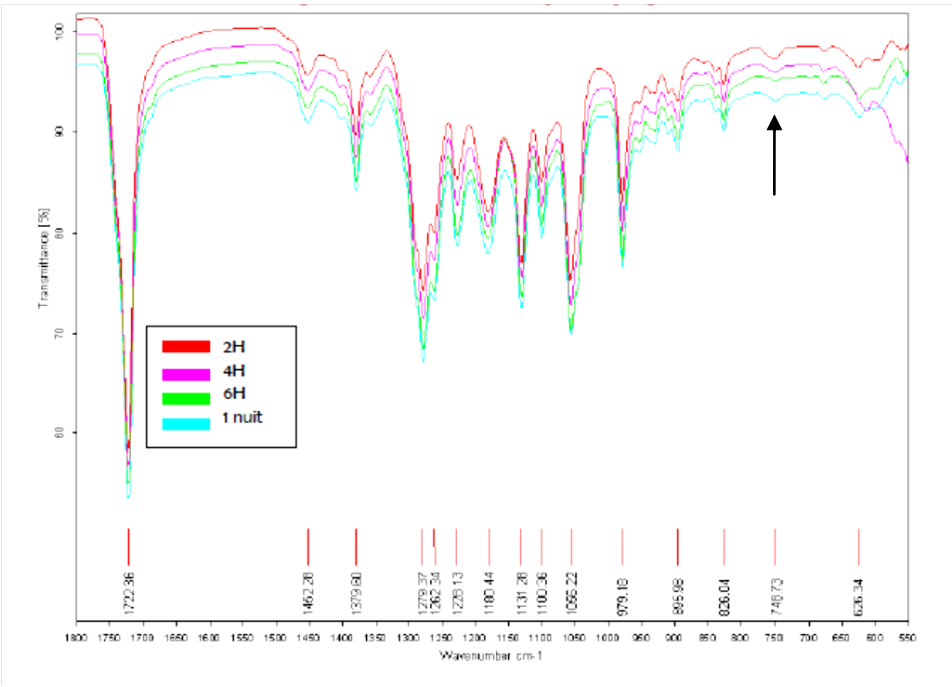


Figure 3-34 : Spectres IRTF présentant l'ouverture des époxydes en fonction de différents temps d'imprégnation des mats dans une solution de cystéamine à 1 M.

La séquence arginine-glycine-acide aspartique (RGD) est connue pour jouer un rôle important dans le processus d'adhésion et la prolifération de certains types cellulaires. En effet, cette séquence a été identifiée comme étant capable de se lier aux intégrines des cellules. L'activité de ces protéines, situées sur la membrane cellulaire, consiste à transduire des signaux qui entraîneront la phosphorylation des protéines du cytosquelette. La séquence RGD portant des fonctions amine pourrait alors être fixée à la surface des fibres de PHBHV-PGMA (PHBHV-épo) par ouverture de la fonction époxyde, comme l'a montrée notre précédente étude afin de favoriser les interactions cellules/matériau.

L'introduction de la séquence RGD a été effectuée suivant le protocole rapporté par Barbey *et al.*[7]. Les mats de PHBHV époxydés (PHBHV-épo) ont été immergés dans une solution d'eau distillée à pH 8,2 avec une concentration en séquence RGD de 1 $mg.mL^{-1}$ pendant 48 h. Les mats ont ensuite été rincés abondement à l'eau distillée puis immergés une nuit dans l'eau distillée sous agitation. Après séchage sous vide, des mesures d'angles de contact ont été effectuées et ont révélé une diminution drastique des valeurs avant et après couplage passant de

81 ° à 0 °. Les fonctions polaires telles que les amines et les acides carboxyliques apportées par le tripeptide ont permis, dans un premier temps, de changer les propriétés de surface en augmentant l'hydrophilie. Cette modification permet d'interpréter le fait que la solution aqueuse imprègne totalement le mat modifié par greffage de la séquence RGD (PHBHV-épo-RGD) alors que le mat de PHBHV-épo a tendance à flotter lorsqu'il est placé en solution aqueuse.

Après plusieurs lavages, les mats modifiés avec la séquence RGD ont été analysés par spectroscopie IRTF (**Figure 3-35**). Dans un premier temps, nous pouvons remarquer l'apparition des signaux caractéristiques des fonctions amine et acide carboxylique du tripeptide dans la zone 3700 cm^{-1} - 3000 cm^{-1}. La présence de ces fonctions polaires est en corrélation avec l'augmentation de l'hydrophilie de la surface des fibres. Les fonctions amide sont également détectables dans la zone 1650 – 1550 cm^{-1}, où le retour à la ligne de base de la bande caractéristique des fonctions carbonyle du PHBHV est beaucoup plus accidenté que sur les spectres du PHBHV natif. D'autre part, la bande caractéristique des fonctions époxyde à 749 cm^{-1} ne semble pas avoir diminué, ce qui démontre que le couplage entre la fonction époxyde du matériau et amine de la séquence RGD reste modeste. Ce résultat peut s'expliquer par la faible concentration en tripeptide utilisée lors du protocole de greffage. Il est important, cependant, de préciser que, malgré plusieurs extractions effectuées après analyse IRTF, les signaux caractéristiques de la séquence RGD ne subissent aucune diminution, ce qui livre un indice supplémentaire sur le greffage effectif de la biomolécule.

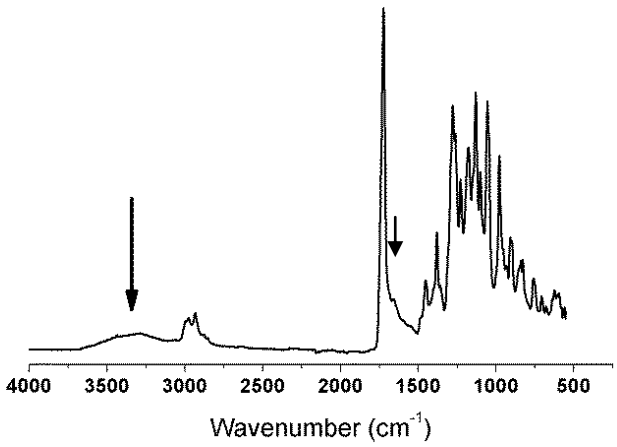


Figure 3-35 : Spectre IRTF présentant l'apparition de bandes caractéristiques de la séquence RGD.

Des études biologiques préliminaires ont été effectuées sur les matériaux réalisés afin d'évaluer l'adhésion et la prolifération des hMSCs ainsi que l'impact des modifications de surface. La **Figure 3-36A** permet d'observer l'adhésion des cellules après 1 h. Sur les 40 000

cellules ensemencées, environ 20 000 cellules ont adhéré à la matrice fibreuse à base de PHBHV, soit environ 50 %. Pour ce premier test, nous pouvons remarquer que la présence de fonctions époxyde entraîne une fixation plus rapide des cellules avec un taux d'adhésion d'environ 70 %. Dans un second temps, la prolifération (**Figure 3-36B**), où 20 000 cellules ont été ensemencées, confirme le caractère non cytotoxique des matériaux avec une croissance cellulaire en augmentation constante. En effet, l'augmentation du nombre de cellules sur les matrices fibreuses de PHBHV et de PHBHV époxydé entre le jour 2 et le jour 5 sont de l'ordre de 175 - 180 %, comparable à celui du TCP qui est de 175 %. Par ailleurs, il est important de noter que l'augmentation du nombre de cellules est plus prononcée pour le matériau fonctionnalisé avec la séquence RGD avec un taux de croissance de 198 %, néanmoins aucune différence significative ($p < 0,05$) n'a été évaluée en comparant avec la matrice PHBHV époxydé.

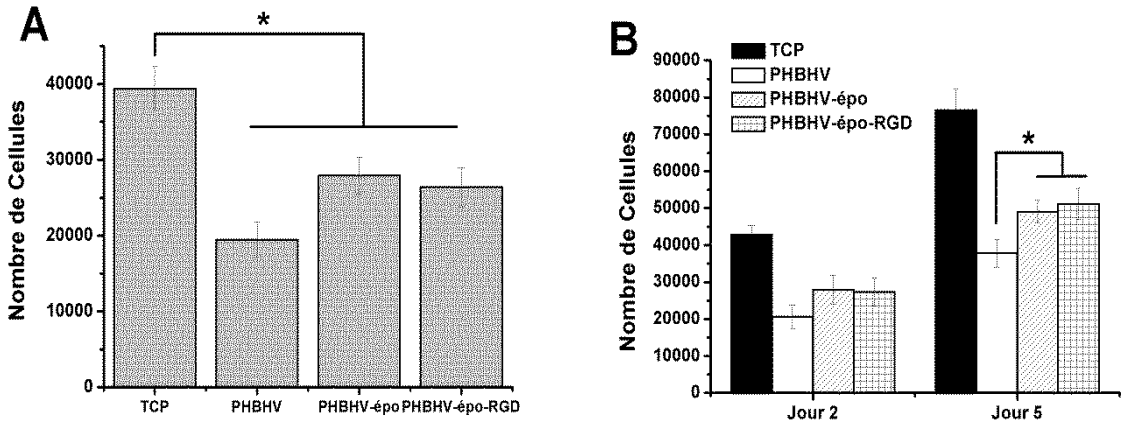


Figure 3-36 : (A) Adhésion et (B) prolifération des hMSCs sur les matrices fibreuses à base de PHBHV, de PHBHV-épo et de PHBHV-épo-RGD. (*) Représente une différence significative ($p < 0,05$) calculée par la méthode *t*-test.

La morphologie des hMSCs présentes sur les différentes matrices fibreuses a été observée par MEB (**Figure 3-37**). Pour les 3 matériaux étudiés, les cellules ont une forme allongée sur les fibres, ce qui révèle des interactions cellules/matériau favorables. Sur les clichés permettant l'observation des hMSCs en développement sur les mats fonctionnalisés (PHBHV-épo et PHBHV-épo-RGD), il est possible de remarquer un nombre de cellules supérieur comparé au mat de PHBHV natif, ainsi qu'une production de MEC plus importante assurant le tissage d'un réseau nécessaire aux échanges des diverses informations. Bien que le dosage du nombre de cellules pour les deux mats fonctionnalisés soit similaire, il semblerait que la production de MEC soit plus prononcée sur le dispositif incorporant la séquence RGD.

PHBHV **PHBHV-épo** **PHBHV-épo-RGD**

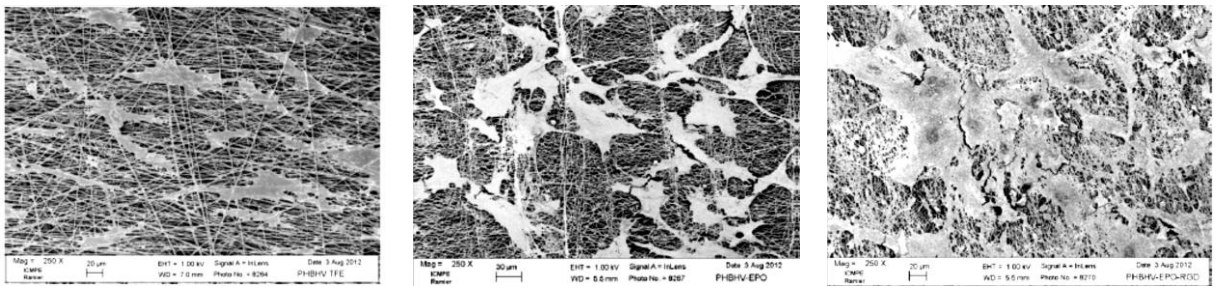


Figure 3-37 : Images de MEB des hMSCs après 5 jours de culture sur des mats de PHBHV, PHBHV-épo et PHBHV-épo-RGD.

3.4. Références bibliographiques

1. Wong, S.-C.; Baji, A.; Leng, S., Effect of fiber diameter on tensile properties of electrospun poly(ε-caprolactone). *Polymer* **2008,** 49, 4713-4722.

2. Li, D.; Frey, M. W.; Joo, Y. L., Characterization of nanofibrous membranes with capillary flow porometry. *J. Membr. Sci.* **2006,** 286, 104-114.

3. Renard, E.; Walls, M.; Guérin, P.; Langlois, V., Hydrolytic degradation of blends of polyhydroxyalkanoates and functionalized polyhydroxyalkanoates. *Polym. Degrad. Stab.* **2004,** 85, 779-787

4. Agarwal, S.; Wendorff, J. H.; Greiner, A., Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* **2008,** 49, 5603-5621.

5. Habraken, W. J. E. M.; Wolke, J. G. C.; Jansen, J. A., Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007,** 59, 234-248.

6. Bear, M. M.; LeboucherDurand, M. A.; Langlois, V.; Lenz, R. W.; Goodwin, S.; Guerin, P., Bacterial poly-3-hydroxyalkenoates with epoxy groups in the side chains. *React. Funct. Polym.* **1997,** 34, 65-77.

7 Barbey, R.; Kauffmann, E.; Ehrat, M.; Klok, H.-A., Protein Microarrays Based on Polymer Brushes Prepared via Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization. *Biomacromolecules* **2010,** 11, 3467-3479.

Chapitre 4

Investigations Biologiques sur les matrices fibreuses à base de PHAs

4.1. Elaboration de matrices biocomposites de PHAs

Dans un contexte d'augmentation constante de la demande en matériaux adaptatifs notamment dans le domaine du traitement de zones osseuses endommagées, plusieurs groupes de recherche se sont tournés vers l'élaboration de dispositifs capables d'être utilisés pour ce type d'application. Les approches de régénération osseuse, impliquant l'utilisation d'une matrice polymère et de cellules souches, peuvent être considérées comme des stratégies alternatives efficaces aux techniques de greffages conventionnelles en permettant l'élaboration de substituts osseux appropriés. Diverses matrices biocomposites réalisées par « electrospinning » à base de polymères synthétiques et/ou naturels ainsi que de composés inorganiques ont été générées en tant que supports de développement cellulaire. Grâce à ses excellentes propriétés d'ostéoinduction et d'ostéoconduction, l'hydroxyapatite (HA) a émergé comme la biocéramique la mieux adaptée pour produire un matériau avec une activité biologique adéquate vis-à-vis de la régénération osseuse.

Les principales méthodes employées pour la fabrication de matrices biocomposites consistent soit en un procédé en deux étapes (élaboration de la matrice puis immersion dans une suspension de nanoparticules d'HA (nHA) pour réaliser un revêtement) ou en une étape par un mélange polymère/biocéramique dans la solution d' « electrospinning » (noté PHB/nHA (blend)). Néanmoins, cette dernière méthode se caractérise par une grande proportion de nHA piégée dans les fibres limitant ainsi les interactions directes avec les cellules. Dans ce contexte, une technique originale combinant simultanément une étape d' « electrospinning » de poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) et d' « electrospraying » de nHA (noté PHB/nHA (spray)) a été mise au point afin de produire de nouvelles structures biocomposites avec une complète exposition des biocéramiques de manière à favoriser les interactions directes avec les cellules.

Plusieurs techniques d'analyse ont permis de mettre en lumière les différences morphologiques entre les matériaux du type PHB/nHA (blend) et PHB/nHA (spray), notamment les microscopies électroniques à balayage et en transmission où la dispersion des nanoparticules nHA et la topographie de surface des fibres des deux matrices sont totalement différentes. D'autre part, des analyses structurales, thermiques et mécaniques ont également été effectuées pour évaluer de manière approfondie les propriétés de ces matériaux à surface spécifique élevée. Le développement cellulaire et l'évolution de la morphologie de cellules à fort potentiel dans le domaine de la régénération tissulaire, à savoir les cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSCs), ont également été étudiés sur les matrices nouvellement élaborées. Les

résultats *in-vitro* ont montré la cytocompatibilité et la capacité à supporter la croissance cellulaire des matériaux avec une prolifération des hMSCs jusqu'à la confluence ainsi que la génération d'un véritable tissu cellulaire sur les matrices biocomposites à base de PHB.

ARTICLE n°4

Original Biocomposite Scaffolds Based on Electrospun Poly(3-hydroxybutyrate) and Electrosprayed Hydroxyapatite Meant for Bone Tissue Engineering

Julien Ramier [a], Olya Stoilova [b], Nevena Manolova [b], Iliya Rashkov [b], Patricia Albanese [c], Valérie Langlois [a], Estelle Renard [a], and Daniel Grande [a,*]

[a] *Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est, Equipe "Systèmes Polymères Complexes," UMR 7182 CNRS – Université Paris-Est Créteil, 2, rue Henri Dunant, Thiais 94320, France*

[b] *Laboratory of Bioactive Polymers, Institute of Polymers, Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev St., bl. 103A, BG-1113 Sofia, Bulgaria*

[c] *Laboratoire "Croissance, Réparation et Régénération Tissulaires", EAC 7149 CNRS – Université Paris-Est Créteil, 61, avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil, France*

Submitted as an article to *Biomacromolecules*

* Corresponding author:
Dr. Daniel Grande
Phone: +33 (0)1 49 78 11 77
Fax: +33 (0)1 49 78 12 08
E-mail: grande@icmpe.cnrs.fr

ABSTRACT

The electrospinning technique coupled with the electrospraying process provides a straightforward and versatile tandem approach to novel nanofibrous biocomposite scaffolds with structural, mechanical, and biological properties potentially suitable for bone tissue regeneration. In this comparative investigation, three different types of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)-based model scaffolds were engineered, namely PHB mats by mere electrospinning of a PHB solution, mats of PHB nanofibers with incorporated hydroxyapatite nanoparticles (nHA) within their structure by electrospinning of a mixed solution containing PHB and nHA, as well as mats constituted of PHB nanofibers with nHA deposited on their surface, formed by electrospinning a PHB solution and electrospraying a nHA dispersion simultaneously. All scaffolds were carefully characterized by several physico-chemical techniques, including SEM, TEM, mercury intrusion porosimetry, contact angle measurements, FTIR, DSC, TGA, and tensile measurements. Furthermore, cell development of pluripotent human mesenchymal stem cells (hMSCs) *in-vitro* cultured on the newly generated nanofibrous biocomposite scaffolds was critically evaluated. The 21 day-monitoring through the use of MTS assays and SEM analyses demonstrated that hMSCs remained viable on PHB/nHA scaffolds and proliferated continuously until reaching confluence.

KEYWORDS

poly(3-hydroxybutyrate), hydroxyapatite nanoparticles, electrospinning, electrospraying, human mesenchymal stem cells, *in-vitro* investigation.

INTRODUCTION

The clinical need for adaptative materials increases continuously to heal bone defects, such as tumor, trauma or skeletal diseases, while essential difficulties involved in viable bone grafting remain unsolved.[1] Autologous and allogeneic grafting are the main techniques employed; however, they present significant limitations, including the difficulty to match properly the defect area, morbidity at the donor sites, and/or disease transmission.[2-4] Multidisciplinary strategies in tissue engineering combine the latest developments in materials science and engineering, cell and molecular biology, as well as (bio)chemical and medical sciences, thus offering new paradigms for the restoration of tissue and organ functions.[5, 6] Hence, bone tissue regeneration approaches coupling bone scaffolds and progenitor cells can be

considered as effective alternative routes to conventional grafting techniques, which permit to engineer viable bone substitutes.[7]

Human mesenchymal stem cells (hMSCs) represent a prospective cell source for many tissue engineering applications, since they can be obtained from various origins, such as bone marrow, umbilical blood, and adipose tissues.[8, 9] hMSCs have a multilineage differentiation potential leading to several specific cell types, including osteoblasts, neuron-like cells, chondrocytes or fibroblasts.[10, 11] Furthermore, bone scaffolds play a crucial role by providing an appropriate substrate for cell growth and differentiation within the bone defect as well as a structural and functional support for new tissue formation. Ideal tissue-engineered scaffolds should be three-dimensional, highly porous, biocompatible and biodegradable frameworks leading to the production of non-toxic degradation products, thus acting as suitable substitutes for the natural extracellular matrix (ECM) by providing cells with the appropriate microenvironment of chemical and physical cues, including cell-cell and cell-matrix interactions.[12-14] To engineer nanofibrous polymeric biomaterials that mimic the ECM, the electrospinning process has emerged as a powerful technique for the generation of tailored scaffolds.[15] Electrospun polymeric scaffolds have received a great deal of attention, for their peculiar characteristics, such as a large surface area to volume ratio, and a high porosity with interconnected voids, may enhance cell attachment and growth, nutrient diffusion, as well as angiogenesis and vascularization in tissue regeneration.[16, 17]

To design useful tailored scaffolds, it is of paramount significance to tune the biomaterial functionalization and the controlled release of bioactive agents like growth or differentiation factors.[18-20] In this context, miscellaneous biocomposite scaffolds formed by synthetic polyesters (*i.e.*, polylactide) and/or natural polymers (*i.e.*, collagen), as well as inorganic compounds, have been engineered to be used as biomaterials supporting cell development.[21-24] Due to its excellent osteoinductive and osteoconductive properties, hydroxyapatite (HA) has emerged as the most suitable bioceramic for generating biocomposite scaffolds with a biological activity toward bone regeneration.[25-28] Notably, the HA incorporation within nanofibrous materials can be carried out by merely electrospinning a mixture of HA with polymer solutions, thus resulting in a potentially difficult or hindered transmission of osteoinductive signals to the cells, because of the HA inclusion inside the fibers. Alternatively, a promising strategy that enables the generation of a uniform layer of nanoparticles on the fiber surface consists in depositing HA by electrospraying, while engineering the fibers by electrospinning. To the best of our knowledge, only a couple of reports on one such challenging tandem strategy have been published so far.[23, 29]

In view of the scarcity of detailed studies on biocomposites elaborated through the use of electrospinning and electrospraying processes, we have undertaken a thorough investigation of the structure and properties of novel nanofibrous biocomposite scaffolds based on electrospun poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and electrosprayed hydroxyapatite nanoparticles (nHA). PHB represents the simplest member of the poly(3-hydroxyalkanoate) family, and these aliphatic biopolyesters have attracted much interest for biomedical applications, due to their renewability, biocompatibility and biodegradability, as well as the non-cytotoxicity of their metabolic products.[30, 31] Only a few scaffolds based on PHB or its statistical copolymers (*i.e.*, poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate)) have hitherto been reported using fibroblasts for skin regeneration,[32, 33] or osteoblasts,[34] and very recently hMSCs for bone tissue engineering.[35] In the present paper, we report on the one-step fabrication and multiscale characterization of model biocomposite materials engineered by two different approaches, namely by electrospinning a PHB/nHA mixture and by combining electrospinning and electrospraying techniques. Furthermore, *in-vitro* hMSC development on these newly generated nanofibrous scaffolds is critically evaluated.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials

Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) with an average molar mass of 330 000 g·mol^{-1} (Biomer, Germany), hydroxyapatite synthetic nanopowder (nHA, particle size < 200 nm, Sigma - Aldrich) was of analytical grade of purity, and used as received. Dimethylformamide (DMF) and chloroform were purchased from Fluka. All other reagents were of analytical grade and were used without further purification. Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs) were purchased from ABCell-Bio (France). Alpha minimum essential medium (αMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin, and 10X phosphate buffered saline (PBS) solutions were purchased from Gibco (Invitrogen, USA). Hexamethyldisilazane (HMDS), and glutaraldehyde were purchased from Sigma-Aldrich.

Generation of PHB-Based Scaffolds

Three types of PHB-based model scaffolds were fabricated: *(i)* PHB mats prepared by electrospinning a PHB solution, *(ii)* mats of PHB/nHA blends prepared by electrospinning a mixed solution containing PHB and nHA, further denoted as PHB/nHA (blend), and *(iii)* mats

constituted of PHB and nHA, formed by electrospinning a PHB solution and electrospraying a nHA dispersion simultaneously; the latter mats were further named PHB/nHA (spray).

PHB mats were prepared by electrospinning a 14 % (w/v) PHB solution obtained after refluxing in $CHCl_3$/DMF (4/1 v/v) at 60 °C. For the generation of the PHB/nHA (blend) system, a 14 % (w/v) PHB solution in $CHCl_3$/DMF (4/1 v/v) was mixed with a previously sonicated dispersion of nHA (15 wt.% with respect to PHB). The electrospinning setup was previously described.[36] Briefly, the polymer (or mixture) solution was placed in a syringe and electrospun directly onto the aluminum home-made rotating grounded drum collector at a flow rate of 3 $mL{\cdot}h^{-1}$ (syringe pump NE-1000, New Era Pump Systems, Inc, Farmingdale, USA). The rotating grounded drum with a diameter of 60 mm was placed at 25 cm from the needle tip, and the rotating speed was maintained at 2000 rpm; a voltage of 25 kV generated by a homemade high voltage power supply was applied. The electrospun mats were placed under reduced pressure at 30 °C to remove any solvent residues.

PHB/nHA (spray) scaffolds were prepared by simultaneous electrospinning and electrospraying using a 14 % (w/v) PHB solution and a nHA dispersion prepared as described above. The PHB solution and the nHA dispersion were placed in separate syringes using two pumps with a common angle of 120 °. A flow rate of 3 $mL{\cdot}h^{-1}$ and a tip-collector distance of 25 cm were used for the electrospinning process, while a flow rate of 2 $mL{\cdot}h^{-1}$ and a 5 cm distance to the collector were applied for the electrospraying process. A voltage of 25 kV was also applied. The selected angle between the pumps permitted an efficient deposition of HA nanoparticles during the PHB fiber formation on the rotating collector. The collected mats were placed under vacuum at 30 °C to remove any solvent residues.

Characterization of Electrospun Scaffolds

The scaffold morphology was studied by scanning electron microscopy (SEM) using an accelerating voltage of 10 kV. Samples of 1 cm^2 were vacuum-coated with gold and examined with a Philips JEOL JSM-5010 microscope. The SEM images were analyzed with the Image J software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD) to determine the average fiber diameter by measuring a total of 20 randomly selected fibers from each image.

Transmission electron microscopy (TEM) and selected area electron diffraction (SAED) observations were carried out with a JEOL JEM 2100 microscope operating at a voltage of 200 kV. The samples were previously prepared by depositing nanofibers on a copper grid.

Pore size distribution and porosity percentage of the electrospun mats were measured using a mercury intrusion porosimeter (Autopore IV, Micromeritics Instruments, Georgia, USA). The determination of porosity features was based on the relationship between the applied pressure (from 1.03 to 206.8 MPa) and the pore diameter into which mercury intrudes (Washburn's equation).

Static contact angles of deionized water (MilliQ water) on the surface of the electrospun mats were measured with a Krüss G10 goniometer at 25 °C using the Drop Shape Analysis software. The electrospun materials were tightly attached to a glass side allowing for the measurement of the contact angles for 10 droplets of 20 µL to obtain the corresponding average value.

Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy analyses were performed using a Bruker Tensor 27 spectrometer equipped with an attenuated total reflection (ATR) accessory (diamond crystal). The spectra were recorded from 3500 to 500 cm^{-1} with a spectral resolution of 4 cm^{-1} and an accumulation of 32 scans. For the Fourier transformation of the interferogram, a Blackman-Harris-3-term apodization function was selected as well as a zero-filling factor of 2 and a standard Mertz procedure for phase correction.

Differential scanning calorimetry (DSC) measurements were conducted on a Perkin Elmer Diamond calorimeter. The samples were heated from -70 °C to + 200 °C at 10 °C·min^{-1}, under nitrogen atmosphere. The melting temperatures were determined from the maxima of the melting peaks.

Thermogravimetric analyses (TGA) were performed on a Setaram Setsys Evolution 16 thermobalance by heating the samples at a rate of 10 °C·min^{-1} from 20 to 900 °C under argon atmosphere.

The mechanical properties of the fibrous scaffolds were evaluated by tensile measurements using an Instron 5965 apparatus (Instron, Norwood, MA) with a 100-N load cell at 25 °C. Specimens with 6 mm × 3.5 mm dimensions were cut and used for analysis at a crosshead speed of 1 mm·min^{-1}. Each sample was analyzed 5 times to obtain average values of tensile strength and strain at break as well as elastic modulus.

Biological Assays

hMSCs were cultured in αMEM medium supplemented with 10 vol.% FBS and 1 vol.% penicillin-streptomycin solution in a 175 cm^2 cell culture flask. Cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 % CO_2 for 2 weeks, and the culture medium was changed

twice per week. Each fibrous scaffold was sterilized under UV light, carefully loaded on a cell-crown mold (Scaffdex, Finland), and placed in a 24-well plate. The specimens were washed with 1X PBS (pH 7.4), and subsequently immersed in the culture medium overnight before cell seeding. Cells were grown to confluence, detached by trypsin, counted by trypan blue assay, and seeded on the scaffolds at a density of 40,000 cells per well for adhesion and 20,000 cells per well for proliferation studies. They were then placed in an incubator with the optimal conditions for cell growth (37 °C, 5 % CO_2). Third-passage hMSCs were used in this investigation.

Cell adhesion on electrospun scaffolds and tissue cultured plates (TCPs) was assessed just 1 h after cell seeding, while cell proliferation was monitored for 21 days using the MTS assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt). The mechanism that underlies this assay is the reduction of yellow tetrazolium salt in MTS to form purple formazan crystals by the dehydrogenase enzymes secreted by mitochondria of metabolically active cells. The formazan dye shows absorbance at 492 nm, and the amount of crystals formed is directly proportional to the number of cells. The process consisted in removing the cell medium and the unattached cells, then the samples were incubated with 20 vol.% MTS reagent in a RPMI 1640 medium (Roswell Park Memorial Institute) for a period of 2 h at 37 °C. The absorbance of the obtained dye was measured at 492 nm using a spectrophotometric plate reader (Infinite 1000, Tecan, North Carolina, USA).

SEM investigation of *in-vitro* cultured hMSCs on the scaffolds was performed after 3 h, 3 days, 6 days, and 21 days of cell culture. Prior to analyses, the scaffolds were rinsed with PBS, and fixed in a 3 wt.% glutaraldehyde solution of PBS with 500 µL per well for 30 min. After cell fixation, the scaffolds were rinsed with deionized water and dehydrated with upgrading concentrations of ethanol (50, 70, 90, 100 vol.%) for 10 min each. The specimens were then dried in 100 % HMDS and air-dried by keeping the samples in a fume hood.

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using Student's *t*-test for the calculation of the significance level of biological data. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Four samples per group were evaluated in cell adhesion and proliferation investigations.

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological and Physico-Chemical Characterizations of Nanofibrous Scaffolds

Electrospinning has proved to be a suitable and powerful technique for designing three-dimensional biomimetic scaffolds for tissue engineering. Such meshworks are generally characterized by a high degree of porosity with interconnected pores allowing for an efficient circulation of the elements necessary for cell development, as well as a high surface area generated by the fibers mimicking the natural ECM.[16] **Figure 1** illustrates typical SEM images of the PHB-based fibrous material and the PHB/nHA biocomposite scaffolds produced either from the simple electrospinning of a mixture constituted of PHB and nHA (PHB/nHA (blend)) or from the simultaneous electrospraying of a nanoparticle suspension along with the electrospinning of a PHB solution (PHB/nHA (spray)). First, the PHB and PHB/nHA (blend) materials exhibited uniform and beadless fibers that were rather oriented in the collector rotation direction (**Figure 1a,d** and **Figure 1b,e**)**.** Furthermore, the PHB/nHA(blend) composite fibers displayed a smooth surface with few HA nanoparticles, whereas the electrospinning-electrospraying combination afforded fibers with a surface largely covered by the bioceramic (**Figure 1c,f**). As a matter of fact, the HA nanoparticles were trapped within the PHB/nHA (blend) fibers, while a rough surface topography was generated by the HA covering for the PHB/nHA (spray) analogues.

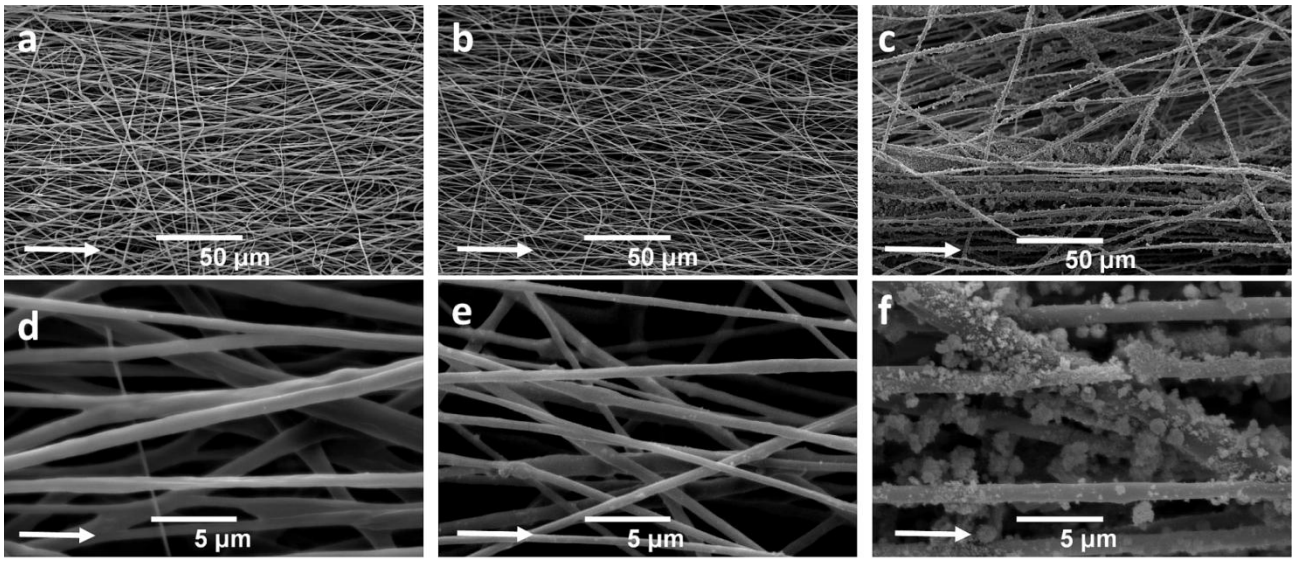


Figure 1. SEM micrographs of electrospun fibers of (a,d) PHB, (b,e) PHB/nHA (blend) and (c,f) PHB/nHA (spray). Arrows indicate the direction of the collector rotation.

In order to get further insight into the scaffold morphology associated with the PHB/nHA (spray) material, both the external surface and the internal structure were analyzed by SEM. As shown in **Figure 2,** the presence of HA aggregation domains on the external surface and within the framework was demonstrated. The occurrence of these aggregates might arise from the generation of attractive spots induced by the bioceramic deposition. Therefore, the electrostatic charges of HA nanoparticles might lead to the aggregate growth during the repeated passages in the electrospraying deposition area. It should be noted that the aggregates grew preferentially along the fibers, and they generated several nodes between the fibers following the direction of the collector rotation. More particularly, **Figure 2f** illustrates an aggregate located in an inter-fiber space linking various fibers. One such inter-fiber bridge also linked fibers from different layers of the material, thus clearly proving that HA aggregates were formed during several passages in the deposition area. Such SEM observations gave evidence that the electrospraying process remained stable for the entire fabrication period of the biocomposite scaffold.

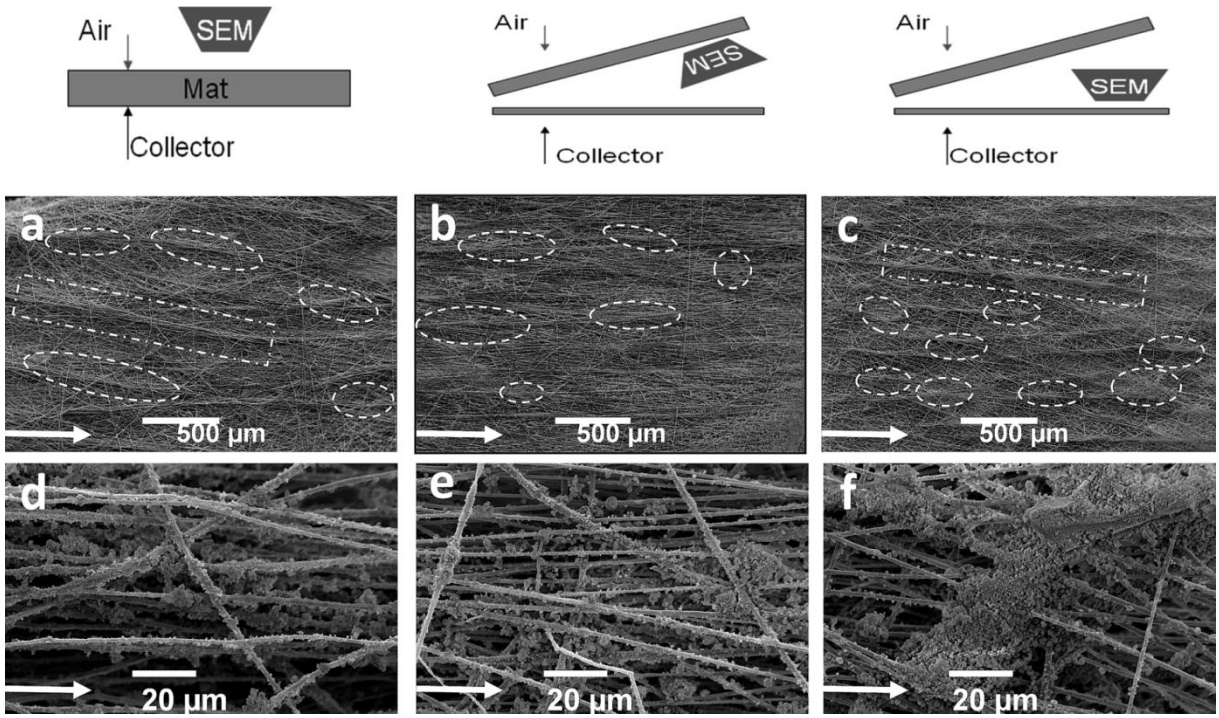


Figure 2. SEM micrographs of the external surface of the electrospun PHB/nHA (spray) scaffold (a,d) and its internal structure (b,e / c,f). Arrows indicate the direction of the collector rotation.

The major difference between both one-step strategies employed, *i.e.* electrospinning of a polymer/HA mixture and electrospinning-electrospraying coupled techniques, was

corroborated by TEM analyses of single fibers from biocomposite scaffolds based on PHB/nHA (blend) (**Figure 3a,b**) and PHB/nHA (spray) (**Figure 3c,d**). The micrographs showed that the PHB/nHA (blend) meshwork contained a large proportion of HA nanoparticles within the constitutive fibers, while a very small proportion lined the fiber surface. Interestingly, during the formation of these composite fibers, hydroxyapatite minerals were trapped within the fibers; therefore, a close contact with cells might be prevented, and the bioactivity of the bioceramic might potentially be inhibited. By means of the electrospinning-electrospraying process, the nanoparticles were electrosprayed simultaneously with the formation of PHB fibers, thus leading to a deposition essentially on the surface of as-formed fibers. As the fiber surface roughness generated by the bioceramic deposition was closely examined, this tandem approach is expected to be the most suitable for designing fibrous scaffolds capable of offering close interactions between cells and nHA.

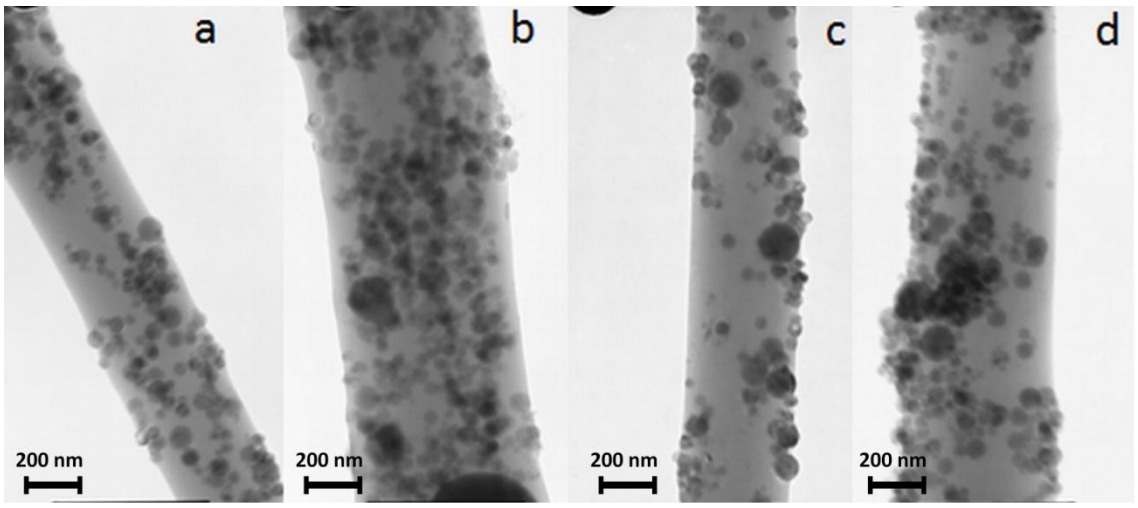


Figure 3. TEM micrographs of single fibers from (a,b) PHB/nHA (blend), and (c,d) PHB/nHA(spray) scaffolds.

Table 1 gathers the main porosity characteristics of the generated meshworks. Submicron values of fiber diameters were determined by SEM. It is noteworthy that the average fiber diameter was lower for the PHB/nHA (blend) material. This could be explained by the higher conductivity (26.6 $\mu S.cm^{-1}$) of the PHB/nHA mixed solution compared to that of the PHB solution (23.4 $\mu S.cm^{-1}$), due to the presence of calcium and phosphate ions. Indeed, the more conductive the solution, the higher its charge capacity, and the stronger the stretching forces, thus leading to a decrease in the fiber diameter. High porosity constitutes an important feature of fibrous materials in order to allow for an efficient circulation of nutriments and wastes, but

also to provide enough void for the ECM regeneration.[37] Pore size ranges and porosity percentages as determined by mercury intrusion porosimetry varied from 1 to 15 µm and from 61 to 77 %, respectively, thus demonstrating highly porous structures (**Table 1**). Obtaining a lower pore size range for the PHB/nHA (blend) system could be correlated to the smaller average fiber diameter, as a decrease in the fiber diameter is generally associated with a reduction of the inter-fiber space.[38] Interestingly, the incorporation of HA nanoparticles by electrospraying led to the generation of a fibrous scaffold with higher porosity. The presence of nanoparticles that covered the fiber surface may prevent a tight layering of PHB nanofibers formed during the electrospinning process, thus generating a looser fiber organization of the scaffold with a higher pore content.

Table 1. Main Porosity Characteristics of PHB, PHB/nHA (blend), and PHB/nHA (spray) Mats

Materials	Fiber Diameter (nm) [a]	Pore Size (µm) [b]	Porosity (%) [b]
PHB	950 ± 160	5-15	61
PHB/nHA (blend)	640 ± 80	1-7	61
PHB/nHA (spray)	950 ± 70	2-11	77

[a] Determined from SEM images using the Image J software.
[b] Values as determined by mercury intrusion porosimetry.

Moreover, the fibrous structures were analyzed through contact angle measurements in order to evidence the hydrophobic nature of the materials after HA incorporation (**Table 2**). For the side exposed to air, all types of fibers displayed a highly hydrophobic surface property with contact angles higher than 117 °. Notably, the presence of hydroxyapatite nanoparticles hardly affected the hydrophilic/hydrophobic balance with contact angles similar to that of neat PHB fibers. As a matter of fact, such results were relatively expected, as the measured contact angle of a nanoparticle layer was equal to 72 ± 3 °, thus attesting of the poor bioceramic hydrophilicity. Additionally, measurements were also performed within the fibrous materials and on their collector side. The slight decrease in contact angles for the fiber surface touching the collector could be related to a decrease in specific surface areas of the first fiber layer that flattened in contact with the aluminum collector.

Table 2. Contact Angle Values on the Air Side, within the Fibrous Materials, and on the Collector Side for the PHB, PHB/nHA (blend), and PHB/nHA (spray) Mats

Materials	Contact Angle on the air side	Contact Angle within the fibrous material	Contact Angle on the collector side
PHB fibers	120 ± 4°	115 ± 3 °	103 ± 3 °
PHB/nHA (blend)	117 ± 2 °	115 ± 4 °	106 ± 2 °
PHB/nHA (spray)	118 ± 2 °	115 ± 2 °	113 ± 2 °

ATR-FTIR spectra (**Figure 4**) of the fibrous materials exhibited the occurrence of PHB characteristic signals with the carbonyl stretching band at 1722 cm^{-1}, the C-O stretching band at 1055 cm^{-1} and the -CH- bands at 2970 cm^{-1}. The phosphate ion (PO_4^{3-}) is a major component of HA with characteristic vibrational bands at 1018 cm^{-1} (stretching) and 569 cm^{-1} (deformation) which were also observed in the PHB/nHA (blend) and PHB/nHA (spray) spectra. Although SEM images already illustrated the hydroxyapatite incorporation, FTIR analyses confirmed the presence of calcium-phosphate minerals in the composition of the fibrous materials, so in turn a connection with the chemical composition of bone.[39]

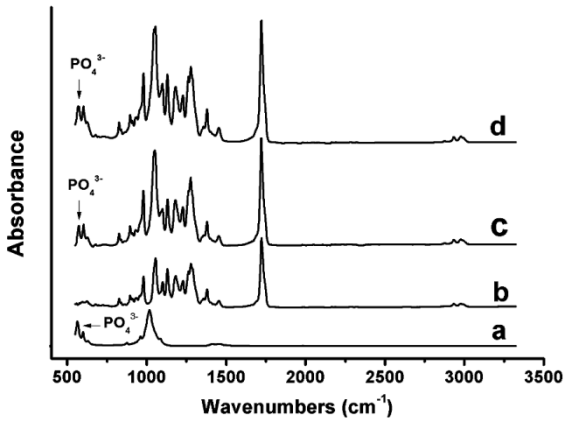


Figure 4. ATR-FTIR spectra of (a) nHA, (b) PHB, (c) PHB/nHA (blend), and (d) PHB/nHA (spray). The spectra have been shifted vertically for the sake of clarity.

The thermal properties of the fibrous materials were first evaluated by DSC to compare them to those of the as-received PHB powder. The PHB-based fibrous material displayed values of melting temperature and enthalpy slightly higher than those corresponding to the powder precursor (**Table 3**). As a matter of fact, the electrospinning process that led to the orientation of macromolecular chains in the longitudinal fiber direction may promote crystallization.[32, 40] It is noteworthy that the values of crystallinity degree for all PHB-based fibrous materials were

nearly constant (49-50 %). The thermal stability of the fibrous materials was then investigated by TGA. Such materials exhibited temperature values of maximum degradation ranging from 250 ° C to 252 °C, while the PHB powder degradation occurred at 267 ° C. This temperature shift could be attributed to the higher specific surface area of the fibrous structures, which led to a more uniform heating within such materials. Indeed, as the heating spread by conduction within the materials, the fibers characterized by a large surface area could reach the degradation temperature faster than the powder precursor of low surface area. Besides, within the temperature range considered (20-900 °C), the HA nanoparticles did not display any degradation.

Table 3. Thermal Characteristics and Crystallinity of PHB-based Materials as Determined by DSC and TGA

Materials	T_m **(°C)** [a]	ΔH_m **(J.g^{-1})** [a]	$\chi_{c,PHB}$ **(%)** [b]	$T_{d(max)}$ **(°C)** [c] **/ Δm (wt. %)**[d]
PHB powder	169	64	44	267 / 50
PHB Fibers	170	72	49	252 / 50
PHB/nHA (blend)	169	72	49	250 / 37
PHB/nHA (spray)	169	73	50	252 / 34

[a] Values as determined by DSC.

[b] $\chi_c = \Delta H_m/\Delta H°_m$ where ΔH_m is the measured enthalpy of melting from DSC thermograms and $\Delta H°_m$ is the melting enthalpy for a 100 % crystalline PHB specimen which is equal to 146.6 J·g^{-1}.[41]

[c] Temperature value of maximum degradation rate.

[d] Mass loss value at degradation temperature $T_{d(max).}$

Mechanical Properties of Nanofibrous Scaffolds

As mentioned in the introduction, the ideal scaffolds should meet several criteria, including biocompatibility, biodegradability, interconnected porosity, and they should also provide a mechanically stable support for cell development and new tissue formation. In this regard, the mechanical properties of the different electrospun meshworks, such as tensile strain and strength, were evaluated.

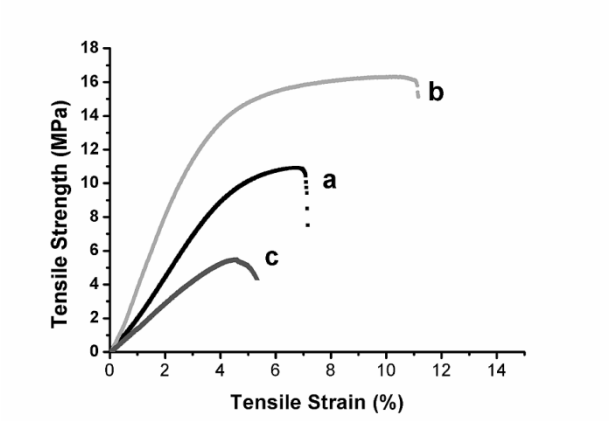


Figure 5. Strength-Strain Curves of (a) PHB, (b) PHB/nHA (blend), and (c) PHB/nHA (spray) Mats. Each curve represents the mean trend after analysis of 5 specimens.

First, **Figure 5** illustrates the stress *vs.* strain curves associated with the PHB and PHB/nHA fibrous materials. Their main mechanical characteristics representative of the tensile properties are gathered in **Table 4**. It turned out that the HA nanoparticle incorporation within the fibers (PHB/nHA (blend)) improved significantly the mechanical properties of PHB mats with an increase of 67 % of the elastic modulus and 51 % of the tensile strength at break. Such an enhancement of the mechanical performances has already been reported several times,[26, 42] and it was attributable to the favorable interactions between the polymer matrix and the bioceramic homogeneously distributed within the fibers, which resulted in an efficient load transfer. Furthermore, a similar trend was observed for the tensile strain at break with an increase of 71 % for the PHB/nHA (blend) material compared to the neat PHB mat. The lower fiber diameter (see **Table 1**) may provide the biocomposite scaffold with a higher ability to absorb an amount of energy before breaking.[43]

Table 4. Tensile Properties of Electrospun Scaffolds

Materials	Tensile strength at break (MPa)	Tensile strain at break (%)	Elastic modulus (MPa)
PHB	10.67 ± 1.01	7.27 ± 0.49	238 ± 0.22
PHB/nHA (blend)	16.16 ± 0.86	12.48 ± 1.57	397 ± 0.27
PHB/nHA (spray)	5.47 ± 0.18	4.90 ± 0.25	138 ± 0.14

In contrast, the mechanical properties of the PHB/nHA (spray) meshwork were poorer than those of the neat PHB mat. The dramatic loss of material stiffness might be related to the higher porosity value (see **Table 1**). As a matter of fact, considering a given volume of sample in the mechanical tests, the amount of polymer fibers in PHB and PHB/nHA (blend) mats was potentially higher than that encountered in the PHB/nHA (spray) specimen, as illustrated in **Figure 6**. The higher porosity of the latter mat may thus induce a sharp decrease in the cohesion of the fibrous material, due to weaker interactions between the constitutive fibers which resulted from the presence of nanoparticles intercalated between the fibers. Consequently, the tensile strength and strain as well as the elastic modulus decreased dramatically in the PHB/nHA (spray).

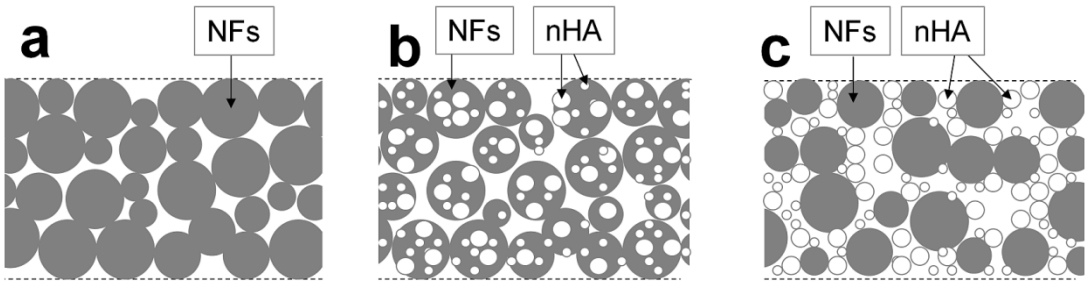


Figure 6. Schematic representation of cross-sections associated with mats constituted of (a) PHB, (b) PHB/nHA (blend), and (c) PHB/nHA (spray). NFs stand for PHB nanofibers and nHA refers to HA nanoparticles.

Investigation of In Vitro hMSC Development on Nanofibrous Scaffolds

Cell development, including adhesion, deployment, and proliferation, represents the first phase of communication between hMSCs and a biomaterial, which is critical for their subsequent differentiation.[44] Moreover, the scaffold properties have a fundamental impact on cell growth and morphology.[45] In this regard, the hMSC ability to colonize the model materials engineered by electrospinning was investigated after 1 h, 1 day, 3 days, 6 days, and 21 days of cell culture using the MTS assay (**Figure 7**). Cell adhesion was evaluated just 1 h after cell seeding. One such investigation revealed that the hydrophobic polyester materials hindered cell adhesion, as the cell number was lower than that found for the treated polystyrene wells (TCPs) used as control systems (**Figure 7a**). Nevertheless, it should be noticed that the value obtained for the PHB/nHA (spray) specimen was slightly higher than those obtained for the other two materials, which might be due to the generation of ionic interactions between the proteins of the culture medium

and the surface-coated bioceramic, as well as the surface roughness resulting in an increase in the specific surface area and the functional group density.[46, 47]

Subsequently, the scaffold ability to support hMSC proliferation was monitored for 21 days with 20,000 cells initially seeded (**Figure 7b**). As expected, the results revealed a higher proliferation on TCPs after 1 day, while the scaffolds of PHB, PHB/nHA (blend) and PHB/nHA (spray) displayed respectively 12,600, 11,000 and 15,400 of numerated cells, which represented between 55 % and 77 % of seeded cells. Similar results have previously been observed by Ramakrishna's group[48, 49] using poly(L-lactide-*co*-ε-caprolactone)-based scaffolds. Again, the behavior differences exhibited between TCPs and polymer fibers could result from the hydrophobic nature of the latters. According to Yang *et al.*,[50] an appropriate combination of hydrophobicity/hydrophilicity associated with surface properties remains a substantial factor able to influence cell adhesion and proliferation on biomaterials. In addition, the first steps of cell adhesion and proliferation seem to be also mediated by the fiber topography which leads to a decrease in the cytoskeleton spreading, and therefore hinders their initial development.[15, 51] Further, **Figure 7b** exhibited hMSC proliferation between 1 and 3 days of cell culture, and this cellular process was particularly significant between 3 and 6 days with a cell number increase of 180 %, 183 % and 175 % for the PHB, PHB/nHA (blend), PHB/nHA (spray) scaffolds, respectively. Comparable proliferation rates with TCP supports (182 %) indicated satisfactory cell development, which proved the ability of the fibrous scaffolds to support viable cell colonization. Furthermore, it is noteworthy that the hMSCs seeded on all the scaffolds reached confluence within 21 days with populations ranging from about 105,000 to 110,000 cells, thus confirming the strong capability of the fibrous meshworks of hosting and supporting viable cell development.

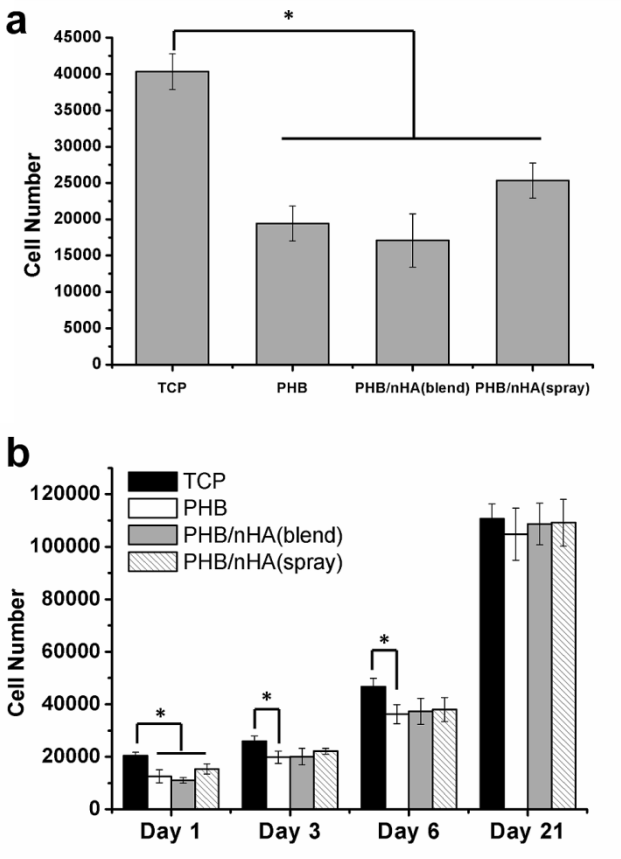


Figure 7. MTS assay of hMSC (a) adhesion and (b) proliferation on fibrous scaffolds of PHB, PHB/nHA (blend), PHB/nHA (spray), and TCPs. Bars represent mean values ± standard deviations (n=4). Asterisks indicate significant difference obtained by *t*-test ($p < 0.05$).

To investigate the evolution of cell morphology on the electrospun materials, SEM analyses were performed after different times of hMSC culture. First of all, after 3 h, several cells with a round-shape morphology could be observed (**Figure 8a-c**). The spherical shape of hMSCs was more clearly observed at high magnification (**Figure 8d-f**), and the reduced spreading surface of cells revealed that hMSCs did not adapt to the fibrous materials yet. Nevertheless, the cellular development as well as the spreading process did begin, as reflected in **Figure 8f** with a cell deployment along the supporting fibers. The hMSC development appeared to be faster on the PHB/nHA (spray) biomaterial, as the cell spreading seemed to be more pronounced in this system.

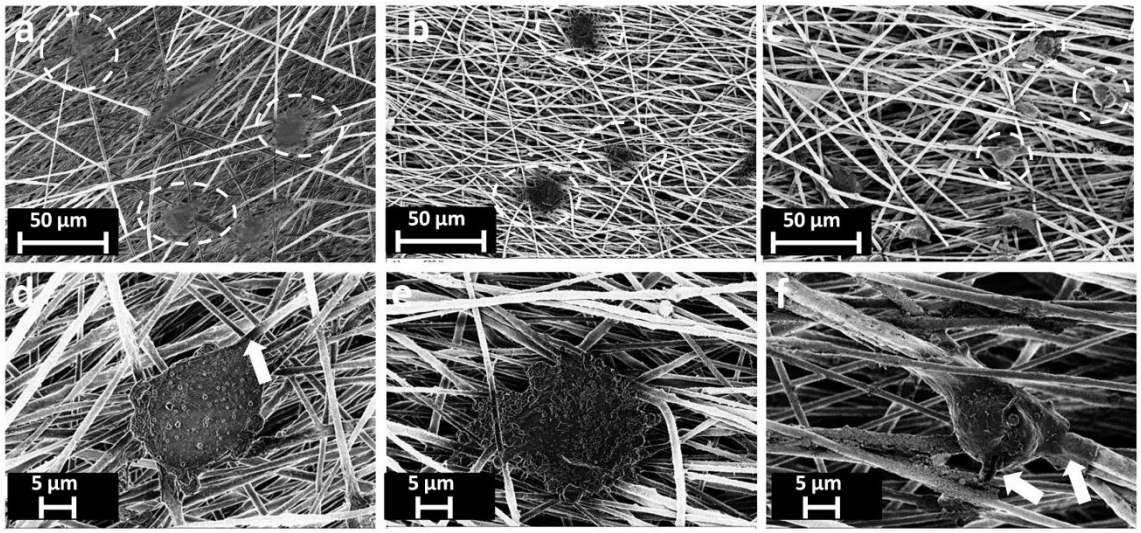


Figure 8. SEM micrographs of fibrous scaffolds after 3 h of hMSC culture on (a,d) PHB, (b,e) PHB/nHA (blend), and (c,f) PHB/nHA (spray).

The hMSC morphology was then examined after 3 days of cell culture (**Figure 9**). Interestingly, **Figure 9a-c** clearly illustrates the change of cell morphology, *i.e.* from a spherical shape to a flattened and spread one. The increase in the spreading surface of cells could be attributed to a significant affinity and favorable interactions with scaffolds. It should be noted that hMSCs grew along the PHB-based fibers, following the direction of the collector rotation. Moreover, the well-spread cells exhibited a strong anchorage to the materials with the occurrence of filopodia forming focal adhesions on the fiber surface. In the process of cell development, the inter-cellular communication is essential in order to exchange miscellaneous signals concerning differentiation or other cell information. The generation of these communication channels was noticeable in **Figure 9d-f** with the formation of natural ECM. Obviously enough, this ECM with spherical pores was mostly generated between two or more close cells through the production of slender cytoplasmic projections.

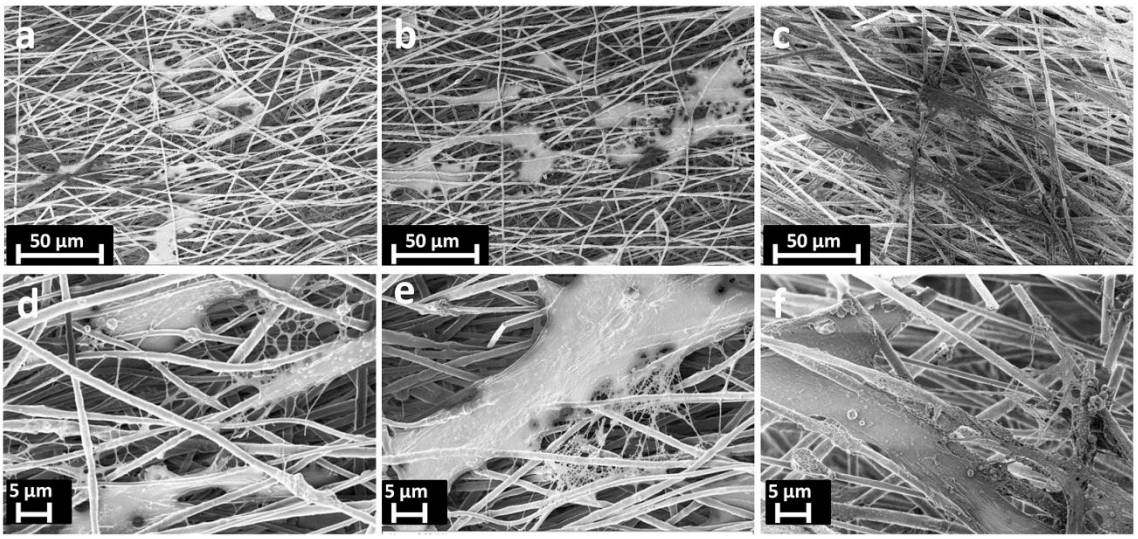


Figure 9. SEM micrographs of fibrous scaffolds after 3 days of hMSC culture on (a,d) PHB, (b,e) PHB/nHA (blend), and (c,f) PHB/nHA (spray).

After 6 days of cell culture, hMSCs were no longer independent, but formed a cell network connected by the ECM, which was an initial step toward the formation of true cellular tissue (**Figure 10**). The spreading surface of cells increased significantly compared to that observed after the third day of cell culture (see **Figure 9**). At high magnification (**Figure 10d-f**), the flattened shape of hMSCs on the biomaterial fibers was clearly observed.

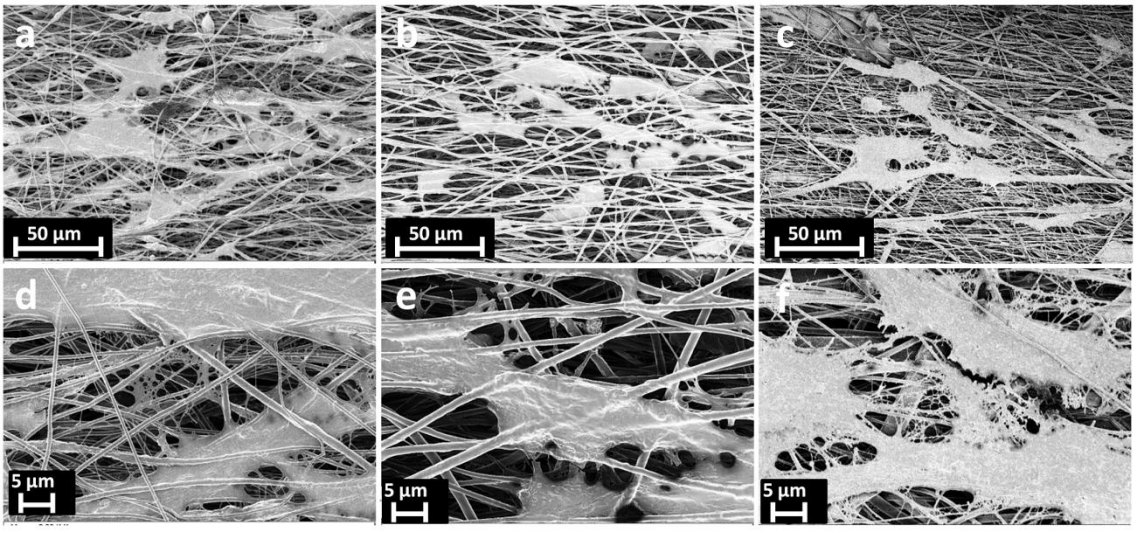


Figure 10. SEM micrographs of fibrous scaffolds after 6 days of hMSC culture on (a,d) PHB, (b,e) PHB/nHA (blend), and (c,f) PHB/nHA (spray).

Lastly, after 3 weeks of cell culture, cell development was investigated in order to get further insight into the cell-biomaterial interactions as well as the ECM production. **Figure 11**

shows well-spread hMSCs with a flattened-shape morphology, thus revealing highly favorable interactions with all the scaffolds and a high cytocompatibility of the latters. Moreover, SEM analyses demonstrated that growing cells tended toward complete colonization of the scaffold surface with the secretion of ECM, indicating the hMSC confluence and the effective generation of cellular tissue.

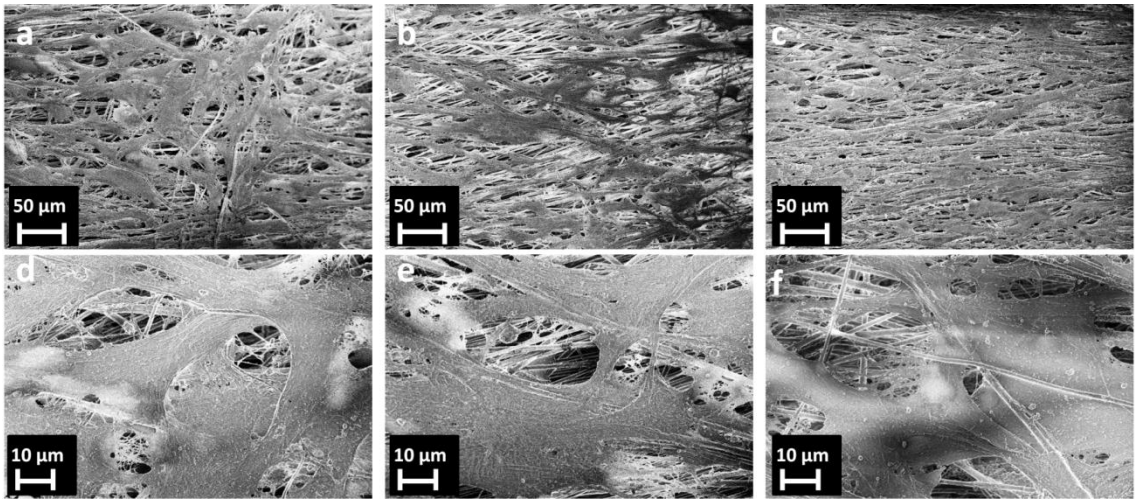


Figure 11. SEM micrographs of fibrous scaffolds after 21 days of hMSC culture on (a,d) PHB, (b,e) PHB/nHA (blend), and (c,f) PHB/nHA (spray).

CONCLUSIONS

This investigation has implemented straightforward and versatile one-step approaches to model PHB/nHA biocomposite scaffolds. In particular, the electrospinning technique coupled with the electrospraying process provides a challenging tandem strategy for the generation of novel nanofibrous materials with structural, mechanical, and biological properties suitable for tissue engineering applications. It has to be stressed that the HA nanoparticles deposition on the fiber surface *via* electrospraying allows for direct interactions with growing cells, thus affording promising scaffolds for bone tissue regeneration. This contribution has clearly demonstrated that hMSCs, which are therapeutic cells desirable for bone repair, remain viable on PHB/nHA fibrous scaffolds during 21 days and proliferate continuously until reaching confluence.

Accordingly, we believe that electrospun biocomposite scaffolds based on biocompatible and biodegradable polyesters, such as poly(3-hydroxyalkanoate)s, will hold relevance as temporary supports for hMSC development and differentiation with a high therapeutic potential in tissue regeneration processes. Furthermore, the electrospraying deposition process should

offer a powerful means to enhance the hMSC osteoblastic differentiation, which is currently under investigation.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank the CNRS (France) and the Bulgarian Academy of Sciences (Bulgaria) for financial support through the bilateral project No. 135751. Financial support from the National Fund of Scientific Research (Grant DO 02-237/2008) is also gratefully acknowledged (J.R., O.S., N.M., and I.R.).

REFERENCES

(1) Frohlich, M.; Grayson, W.; Wan, L.; Marolt, D.; Drobnic, M.; Vunjak-Novakovic, G., *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **2008,** 3, 254-264.
(2) Conway, J. D., *Orthop. Clin. North Am.* **2010,** 41, 75-84.
(3) Grayson, W. L.; Frohlich, M.; Yeager, K.; Bhumiratana, S.; Chan, M. E.; Cannizzaro, C.; Wan, L. Q.; Liu, X. S.; Guo, X. E.; Vunjak-Novakovic, G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010,** 107, 3299-3304.
(4) Kohn, D.; Sander-Beuermann, A., *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* **1994,** 2, 219-223.
(5) Langer, R.; Vacanti, J., *Science* **1993,** 260, 920-926.
(6) Lavik, E.; Langer, R., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004,** 65, 1-8.
(7) Petite, H.; Viateau, V.; Bensaid, W.; Meunier, A.; de Pollak, C.; Bourguignon, M.; Oudina, K.; Sedel, L.; Guillemin, G., *Nat. Biotechnol.* **2000,** 18, 959-963.
(8) Erices, A.; Conget, P.; Minguell, J. J., *Br. J. Haematol.* **2000,** 109, 235-242.
(9) Gronthos, S.; Franklin, D. M.; Leddy, H. A.; Robey, P. G.; Storms, R. W.; Gimble, J. M., *J. Cell. Physiol.* **2001,** 189, 54-63.
(10) Li, L. F.; Bai, X. J.; Gong, X. L.; Liu, H. K.; Chen, L. A.; Guan, W. J.; Ma, Y. H., *Journal of Genetics and Genomics* **2009,** 36, 133-140.
(11) Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D.; Moorman, M. A.; Simonetti, D. W.; Craig, S.; Marshak, D. R., *Science* **1999,** 284, 143-147.
(12) Peter, S. J.; Miller, M. J.; Yasko, A. W.; Yaszemski, M. J.; Mikos, A. G., *J. Biomed. Mater. Res.* **1998,** 43, 422-427.
(13) Shoichet, M. S., *Macromolecules* **2010,** 43, 581-591.
(14) Van Vlierberghe, S.; Dubruel, P.; Schacht, E., *Biomacromolecules* **2011,** 12, 1387-1408.
(15) Pham, Q. P.; Sharma, U.; Mikos, A. G., *Tissue Eng.* **2006,** 12, 1197-1211.
(16) Sill, T. J.; von Recum, H. A., *Biomaterials* **2008,** 29, 1989-2006.
(17) Yoo, H. S.; Kim, T. G.; Park, T. G., *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009,** 61, 1033-1042.
(18) Martins, A.; Duarte, A. R. C.; Faria, S.; Marques, A. P.; Reis, R. L.; Neves, N. M., *Biomaterials* **2010,** 31, 5875-5885.
(19) Ravichandran, R.; Venugopal, J. R.; Sundarrajan, S.; Mukherjee, S.; Ramakrishna, S., *Biomaterials* **2012,** 33, 846-855.
(20) Spadaccio, C.; Rainer, A.; Centola, M.; Trombetta, M.; Chello, M.; Lusini, M.; Covino, E.; Toyoda, Y.; Genovese, J. A., *Regen. Med.* **2010,** 5, 645-657.
(21) Agarwal, S.; Wendorff, J. H.; Greiner, A., *Polymer* **2008,** 49, 5603-5621.

(22) Han, J.; Lazarovici, P.; Pomerantz, C.; Chen, X.; Wei, Y.; Lelkes, P. I., *Biomacromolecules* **2010,** 12, 399-408.
(23) Gupta, D.; Venugopal, J.; Mitra, S.; Giri Dev, V. R.; Ramakrishna, S., *Biomaterials* **2009,** 30, 2085-2094.
(24) Prabhakaran, M. P.; Venugopal, J.; Ramakrishna, S., *Acta Biomater.* **2009,** 5, 2884-2893.
(25) Jang, J. H.; Castano, O.; Kim, H. W., *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009,** 61, 1065-1083.
(26) Jose, M. V.; Thomas, V.; Johnson, K. T.; Dean, D. R.; Nyairo, E., *Acta Biomater.* **2009,** 5, 305-315.
(27) Seyedjafari, E.; Soleimani, M.; Ghaemi, N.; Shabani, I., *Biomacromolecules* **2010,** 11, 3118-3125.
(28) Whited, B. M.; Whitney, J. R.; Hofmann, M. C.; Xu, Y.; Rylander, M. N., *Biomaterials* **2011,** 32, 2294-2304.
(29) Francis, L.; Venugopal, J.; Prabhakaran, M. P.; Thavasi, V.; Marsano, E.; Ramakrishna, S., *Acta Biomater.* **2010,** 6, 4100-4109.
(30) Chen, G.-Q.; Wu, Q., *Biomaterials* **2005,** 26, 6565-6578.
(31) Misra, S. K.; Valappil, S. P.; Roy, I.; Boccaccini, A. R., *Biomacromolecules* **2006,** 7, 2249-2258.
(32) Asran, A. S.; Razghandi, K.; Aggarwal, N.; Michler, G. H.; Groth, T., *Biomacromolecules* **2010,** 11, 3413-3421.
(33) Kuppan, P.; Vasanthan, K. S.; Sundaramurthi, D.; Krishnan, U. M.; Sethuraman, S., *Biomacromolecules* **2011,** 12, 3156-3165.
(34) Sombatmankhong, K.; Sanchavanakit, N.; Pavasant, P.; Supaphol, P., *Polymer* **2007,** 48, 1419-1427.
(35) Wang, Y.; Gao, R.; Wang, P.-P.; Jian, J.; Jiang, X.-L.; Yan, C.; Lin, X.; Wu, L.; Chen, G.-Q.; Wu, Q., *Biomaterials* **2012,** 33, 485-493.
(36) Mincheva, R.; Manolova, N.; Paneva, D.; Rashkov, I., *J. Bioact. Compat. Polym.* **2005,** 20, 419-435.
(37) Agrawal, C. M.; Ray, R. B., *J. Biomed. Mater. Res.* **2001,** 55, 141-150.
(38) Li, D.; Frey, M. W.; Joo, Y. L., *J. Membr. Sci.* **2006,** 286, 104-114.
(39) Boskey, A.; Pleshko Camacho, N., *Biomaterials* **2007,** 28, 2465-2478.
(40) Wong, S.-C.; Baji, A.; Leng, S., *Polymer* **2008,** 49, 4713-4722.
(41) Barham, P. J.; Keller, A.; Otun, E. L.; Holmes, P. A., *J. Mater. Sci.* **1984,** 19, 2781-2794.
(42) Thomas, V.; Dean, D. R.; Jose, M. V.; Mathew, B.; Chowdhury, S.; Vohra, Y. K., *Biomacromolecules* **2007,** 8, 631-637.
(43) Jeong, S. I.; Ko, E. K.; Yum, J.; Jung, C. H.; Lee, Y. M.; Shin, H., *Macromol. Biosci.* **2008,** 8, 328-338.
(44) Venugopal, J. R.; Low, S.; Choon, A. T.; Kumar, A. B.; Ramakrishna, S., *Artif. Organs* **2008,** 32, 388-397.
(45) Beachley, V.; Wen, X., *Prog. Polym. Sci.* **2010,** 35, 868-892.
(46) Martinez, E. C.; Ivirico, J. L. E.; Criado, I. M.; Ribelles, J. L. G.; Pradas, M. M.; Sanchez, M. S., *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **2007,** 18, 1627-1632.
(47) Wei, G.; Ma, P. X., *Biomaterials* **2004,** 25, 4749-4757.
(48) Jin, G.; Prabhakaran, M. P.; Ramakrishna, S., *Acta Biomater.* **2011,** 7, 3113-3122.
(49) Prabhakaran, M. P.; Venugopal, J. R.; Ramakrishna, S., *Biomaterials* **2009,** 30, 4996-5003.
(50) Yang, X.; Zhao, K.; Chen, G.-Q., *Biomaterials* **2002,** 23, 1391-1397.
(51) Badami, A. S.; Kreke, M. R.; Thompson, M. S.; Riffle, J. S.; Goldstein, A. S., *Biomaterials* **2006,** 27, 596-606.

4.2. Différentiation ostéogénique de hMSC sur des matrices biocomposites de PHAs

Suite à la section 4.1, où un nouveau principe de fabrication d'une structure fibreuse biocomposite a été rapporté, nous avons poursuivi nos investigations sur l'élaboration par ce même procédé d'une matrice composée de PHB ainsi que d'une protéine de la MEC : la gélatine (GEL). Le PHB représente le polymère plus simple de la famille des poly(3-hydroxyalcanoate)s (PHAs). Bien que ces biopolyesters soient de plus en plus étudiés dans le domaine biomédical, aucune investigation biologique poussée n'a été développée en mettant en jeu des matériaux fibreux à base de PHAs et d'hydroxyapatite avec des hMSCs pour des applications en régénération osseuse. Dans ce contexte, nous avons effectué une étude approfondie sur la prolifération, la différentiation et la minéralisation des hMSCs en contact avec quatre types de matériaux différents à base de PHB.

Afin d'évaluer les apports de chaque élément constituant les fibres, quatre matériaux modèles ont été élaborés dont trois par « electrospinning » à base de PHB, PHB/GEL et PHB/GEL/nHA (PHB/GEL/nHA (blend)). La quatrième matrice a été réalisée par le procédé couplé d' « electrospinning/electrospraying » à partir d'une solution de mélange de polymères (PHB/GEL) et d'une suspension de nHA, (PHB/GEL/HA (spray)). Comme précédemment, les structures élaborées ont été analysées par diverses techniques telles que la spectroscopie infra-rouge, la porosimétrie au mercure ainsi que les microscopies électroniques à balayage et en transmission afin de mettre en évidence les différences structurales et morphologiques de ces nouveaux biomatériaux. Concernant l'investigation biologique, deux phases ont été évaluées, la première correspondant à une analyse de la prolifération et de la morphologie des cellules à court terme (6 jours), et la seconde correspondant à l'analyse de la différentiation des hMSCs vers un phénotype ostéoblastique à long terme (21 jours). Les résultats des études à court terme ont révélé que la présence de gélatine (GEL) au sein des matériaux induit un développement cellulaire bien plus rapide, avec un déploiement des hMSCs dès 3 heures de culture tandis que les cellules ensemencées sur les matrices de PHB en absence de GEL ont encore une morphologie sphérique. La présence d'une protéine de la MEC favorise donc les interactions matériau/cellule, cependant aucune différence significative n'a été observée concernant la prolifération. Les études de différentiation à long terme ont montré une amélioration significative de la différentiation ostéoblastique (dosée par l'activité de la phosphatase alcaline) et de la minéralisation (coloration des minéraux de calcium, et analyse EDX) des hMSCs pour la matrice PHB/GEL/nHA (spray) où la présence de nHA à la surface des fibres favorise

considérablement la différentiation des hMSCs en raison d'interactions directes entre la biocéramique et les cellules.

ARTICLE n°5

Poly(3-hydroxyalkanoate)/Gelatin/Hydroxyapatite-Based Biocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering: From Design to *In-vitro* Investigation of Cell Differentiation

Julien Ramier [a], Olya Stoilova [b], Nevena Manolova [b], Iliya Rashkov [b], Patricia Albanese [c], Valérie Langlois [a], Estelle Renard [a], and Daniel Grande [a,*]

[a] *Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est, Equipe ''Systèmes Polymères Complexes,'' UMR 7182 CNRS – Université Paris-Est Créteil, 2, rue Henri Dunant, Thiais 94320, France*

[b] *Laboratory of Bioactive Polymers, Institute of Polymers, Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev St., bl. 103A, BG-1113 Sofia, Bulgaria*

[c] *Laboratoire "Croissance, Réparation et Régénération Tissulaires", EAC 7149 CNRS – Université Paris-Est Créteil, 61, avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil, France*

Submitted as an article to *Biomaterials*

* Corresponding author:
Dr. Daniel Grande
Phone: +33 (0)1 49 78 11 77
Fax: +33 (0)1 49 78 12 08
E-mail: grande@icmpe.cnrs.fr

ABSTRACT

Electrospinning possibly coupled with electrospraying provides a straightforward and robust route toward promising electrospun biocomposite scaffolds with a potentially mineralized surface for bone tissue engineering. In this comparative investigation, four types of poly(3-hydroxybutyrate) PHB-based nanofibrous scaffolds were fabricated, namely PHB mats prepared by electrospinning of a PHB solution, mats of PHB/gelatin (GEL) blends prepared by electrospinning of a PHB/GEL mixture solution, mats of PHB/GEL/hydroxyapatite nanoparticles (nHA) blends prepared by electrospinning of a PHB/GEL/nHA mixed solution, and mats constituted of PHB, GEL and nHA, formed by electrospinning a PHB/GEL solution and electrospraying a nHA dispersion simultaneously. SEM and TEM analyses demonstrated that the nHA-blended framework contained a vast majority of nHAs trapped within the constitutive fibers, whereas the electrospinning-electrospraying combination afforded fibers with a rough surface largely covered by the bioceramic. Structural and morphological characterizations were completed by FTIR, mercury intrusion porosimetry, and contact angle measurements. Furthermore, an *in-vitro* human mesenchymal stem cell (hMSC) adhesion and proliferation investigation within a six-day period showed a faster cell development on gelatin-containing scaffolds. More interestingly, a long-term investigation of hMSC osteoblastic differentiation over 21 days was carried out, through the assessment of alkaline phosphatase (ALP) activity and the qualitative as well as quantitative determination of matrix biomineralization through the staining of the generated calcium deposits. It turned out that hMSCs seeded onto the nHA-sprayed scaffold developed a significantly higher level of ALP activity, as well as a higher biomineralization rate: the fiber surface deposition of nHAs by electrospraying enabled their direct exposure to hMSCs for an efficient transmission of the bioceramic osteoinductive and osteoconductive properties.

KEYWORDS

poly(3-hydroxybutyrate), gelatin, hydroxyapatite, electrospinning, electrospraying, human mesenchymal stem cells, cell proliferation, osteogenic differentiation.

INTRODUCTION

The clinical need for adaptative materials increases continuously to heal bone defects, such as tumor, trauma or skeletal diseases, while essential difficulties involved in viable bone grafting remain unsolved [1]. Autologous and allogeneic grafting techniques are mainly

employed; nevertheless, they present significant limitations, including the difficulty to match properly the defect area, morbidity at the donor sites, and/or disease transmission [2-4]. Multidisciplinary strategies in tissue engineering combine the latest developments in materials science and engineering, cell and molecular biology, as well as (bio)chemistry and medicine, thus offering new paradigms for the restoration of tissue and organ functions [5]. Hence, bone tissue regeneration approaches coupling bone scaffolds and progenitor cells can be considered as effective alternative routes which permit to engineer viable bone substitutes [6].

Furthermore, bone scaffolds play a pivotal role by providing an appropriate substrate for cell growth and differentiation within the bone defect as well as a structural and functional support for new tissue formation. Ideal three-dimensional tissue-engineered scaffolds should be highly porous, biocompatible and biodegradable frameworks leading to the production of non-toxic products, thus acting as suitable substitutes for the natural extracellular matrix (ECM) by providing cells with the appropriate microenvironment of chemical and physical cues, including cell-cell and cell-matrix interactions [7]. To engineer nanofibrous polymeric biomaterials that mimic the ECM, the electrospinning process has emerged as a powerful technique for the generation of tailored scaffolds [8]. Electrospun polymeric scaffolds have received widespread interest, as their peculiar characteristics, including a large surface area to volume ratio, and a high porosity with interconnected voids, may enhance cell attachment and growth, nutrient diffusion, as well as angiogenesis and vascularization in tissue regeneration [9,10].

To design useful tailored scaffolds, it is of paramount significance to tune the biomaterial functionalization and the controlled release of bioactive agents like growth or differentiation factors [11-13]. In this context, miscellaneous biocomposite scaffolds formed by synthetic polyesters (*i.e.*, polylactide) and/or natural polymers (*i.e.*, gelatin), as well as inorganic compounds, have been engineered to be used as biomaterials supporting cell development [14-17]. Gelatin, which is derived from collagen and has been widely used for various biomedical applications, is generally chosen as a biofunctionalization component, thanks to its bioaffinity leading to faster cell attachment and development, its lack of antigenicity, as well as its formability and cost efficiency [17-19]. On the other hand, due to its excellent osteoinductive and osteoconductive properties, hydroxyapatite (HA) has emerged as the most suitable bioceramic for generating biocomposite scaffolds with a biological activity toward bone regeneration [20-23]. Notably, the HA incorporation within nanofibrous materials can be carried out by merely electrospinning a mixture of HA with polymer solutions, thus resulting in a potentially difficult or hindered transmission of osteoinductive signals to the cells, because of the HA inclusion inside the fibers. Alternatively, a promising strategy that enables the generation of a uniform layer of nanoparticles on the fiber surface consists in depositing HA by electrospraying, while engineering the fibers *via* electrospinning. To the best of our knowledge,

only a couple of reports on one such challenging tandem approach have been published so far [15,24].

In view of the scarcity of detailed studies on biocomposites elaborated through the use of electrospinning and electrospraying processes, we have undertaken a thorough investigation of the structure and properties of novel biocomposite scaffolds based on electrospun poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and gelatin (GEL) nanofibers, and electrosprayed hydroxyapatite nanoparticles (nHAs). PHB represents the simplest member of the poly(3-hydroxyalkanoate) family, and these aliphatic biopolyesters have attracted much interest for biomedical applications, due to their renewability, biocompatibility and biodegradability, as well as the non-cytotoxicity of their metabolic products [25,26]. Only a few scaffolds based on PHB or its statistical copolymers (*i.e.*, poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate)) have hitherto been reported using fibroblasts for skin regeneration [27,28], or osteoblasts [29], and very recently human mesenchymal stem cells (hMSCs) for bone tissue engineering [30].

In the present paper, we report on and compare the one-step fabrication and characterization of new nanofibrous biocomposite materials engineered by two different approaches, namely by electrospinning a PHB/GEL/nHA mixture and by combining electrospinning and electrospraying techniques. Moreover, we have closely examined *in-vitro* hMSC development on the newly generated scaffolds during the first steps of cell proliferation. Further, hMSCs osteogenic differentiation is critically evaluated from both the assessment of alkaline phosphatase activity and the qualitative as well as quantitative determination of matrix biomineralization through the staining of the generated calcium deposits.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials

Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) with a number-average molar mass (M_n) of 330 000 g·mol^{-1} and trifluoroethanol (TFE) were respectively purchased from Biomer (Germany) and Roth (France). Synthetic hydroxyapatite nanoparticles (nHAs, particle size < 200 nm), type B gelatin (GEL) from bovine skin, glutaraldehyde solution (25 wt.%), and hexamethyldisilazane (HMDS) were purchased from Sigma-Aldrich. All other reagents were of analytical grade and were used without further purification. Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs) were purchased from ABCell-Bio (France), while alpha Minimum Essential Medium (αMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), penicillin-streptomycin (PS), and Phosphate Buffered Saline (PBS) solutions were purchased from Gibco (Invitrogen, USA) solutions.

Preparation of PHB, PHB/GEL and PHB/GEL/nHA Scaffolds

Four types of PHB-based fibrous scaffolds were fabricated: *(i)* PHB mats prepared by electrospinning of a PHB solution, *(ii)* mats of PHB/GEL blends prepared by electrospinning of a PHB/GEL mixture solution, and further denoted as PHB/GEL, *(iii)* mats of PHB/GEL/nHA blends prepared by electrospinning of a PHB/GEL/nHA mixed solution, and further denoted as PHB/GEL/nHA (blend), and *(iv)* mats constituted of PHB, GEL and nHA, formed by electrospinning a PHB/GEL solution and electrospraying a nHA dispersion simultaneously; the latter mats were further named PHB/GEL/nHA (spray).

PHB mats were prepared by electrospinning a 10 % (w/v) PHB solution in TFE. For the generation of the PHB/GEL fibrous material, a polymer mixture in a ratio of 75/25 (w/w) was dissolved in TFE overnight to form a 10 % (w/v) solution. For the fabrication of the PHB/GEL/nHA (blend) system, a 10 % (w/v) PHB/GEL (75/25 w/w) solution in TFE was mixed with a previously sonicated dispersion of nHAs (20 wt.% with respect to PHB/GEL). The electrospinning setup was described elsewhere [31]. Briefly, the polymer solution was placed in a syringe and electrospun directly onto an aluminum rotating grounded drum collector at a flow rate of 1 $mL.h^{-1}$ (syringe pump NE-1000, New Era Pump Systems, Inc, Farmingdale, USA). The rotating grounded drum was placed at 25 cm from the needle tip, and the rotating speed was maintained at 2500 rpm; a voltage of 25 kV generated by a high-voltage power supply (Linari, Italy) was applied. 20 mL of each solution were electrospun to achieve pure PHB, mixed PHB/GEL, and composite PHB/GEL/nHA (blend) electrospun mats. The electrospun mats were placed under reduced pressure at 30 °C to remove any solvent residues.

PHB/GEL/nHA (spray) scaffolds were prepared by simultaneous electrospinning and electrospraying using a 10 % (w/v) PHB/GEL (75/25 w/w) solution and a nHA dispersion prepared as described above. The PHB/GEL solution and the nHA dispersion were placed in separate syringes using two pumps with a common angle of 120 °. A flow rate of 1 $mL.h^{-1}$ and a tip-to-collector distance of 25 cm were used for the electrospinning process, while a flow rate of 2 $mL.h^{-1}$ and a 5 cm tip-to-collector distance was applied for the electrospraying process. A voltage of 25 kV was also applied. The selected angle between the pumps permitted an efficient deposition of HA nanoparticles during the PHB fiber formation on the rotating collector. The collected mats were placed under vacuum at 30 °C to remove any solvent residues

Characterization of Electrospun Scaffolds

The scaffold morphology was studied using scanning electron microscopy (SEM) with an accelerating voltage of 1 kV. The samples (1 cm^2) were first vacuum-covered with a 4-nm layer of palladium/platinum alloy in a Cressington 208 HR sputter-coater for a better conductivity during the imaging, and then examined by a LEO 1530 SEM microscope equipped with an InLens detector. The SEM images were analyzed with the Image J software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD) to determine the average fiber diameter by measuring a total of 20 randomly selected fibers from each image.

Transmission electron microscopy (TEM) observations were carried out with a FEI Tecnai F20 ST microscope operating at a voltage of 200 kV. The field-emission gun was operated at a 3.8 kV extraction voltage. The samples were previously prepared by depositing nanofibers on a copper grid.

Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy analyses were performed using a Bruker Tensor 27 spectrometer equipped with an attenuated total reflection (ATR) accessory (diamond crystal). The spectra were recorded from 3500 to 500 cm^{-1} with a spectral resolution of 4 cm^{-1} and an accumulation of 32 scans. For the Fourier transformation of the interferogram, a Blackman-Harris-3-term apodization function was selected as well as a zero-filling factor of 2 and a standard Mertz procedure for phase correction.

Static contact angles of deionized water (MilliQ water) on the surface of the electrospun mats were measured with a Krüss G10 goniometer at 25 °C using the Drop Shape Analysis software. The electrospun materials were tightly attached to a glass side, thus allowing for the measurement of the contact angles for 10 droplets of 20 µL to obtain the corresponding average value.

Pore size distribution and porosity percentage of the electrospun mats were measured using a mercury intrusion porosimeter (Autopore IV, Micromeritics Instruments, Georgia, USA). The determination of porosity features was based on the relationship between the applied pressure (from 1.03 to 206.8 MPa) and the pore diameter into which mercury intrudes (Washburn's equation).

Biological Investigations

hMSCs were cultured in αMEM medium supplemented with 10 % (v/v) FBS and 1 % (v/v) penicillin-streptomycin solution in a 175 cm^2 cell culture flask. Cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 % CO_2 for 2 weeks, and the culture medium was changed twice per week. Each fibrous scaffold was sterilized under UV light, carefully loaded on

a cell-crown mold (Scaffdex, Finland), and placed in a 24-well plate. The specimens were washed with phosphate buffered saline (PBS), and subsequently immersed in the culture medium overnight before cell seeding. Cells were grown to confluence, detached by trypsin, counted by a trypan blue assay, and seeded on the scaffolds at a density of 20,000 cells per well for proliferation and differentiation studies. They were then placed in an incubator with the optimal conditions for cell growth. Third-passage hMSCs were used in this study, and their response was investigated in two distinct phases:

- first, the short-term hMSC adhesion and proliferation on the nanofibrous scaffolds using a supplemented αMEM medium within a 6-day period;
- and second, the long-term hMSC proliferation, differentiation, and matrix production using an osteogenic differentiation medium (αMEM with 10% FBS, 1% PS, 10^{-8} M dexamethasone, 10 mM β-glycerophosphate, 50 $\mu g.mL^{-1}$ ascorbic acid) over 21 days to observe significant changes, such as surface mineralization.

The short-term cell proliferation on electrospun scaffolds and Tissue Cultured Plates (TCPs) was evaluated after 1, 3, and 6 days of culture using the MTS assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt). The mechanism that underlies this assay is the reduction of yellow tetrazolium salt in MTS to form purple formazan crystals by the dehydrogenase enzymes secreted by mitochondria of metabolically active cells. The formazan dye shows absorbance at 492 nm, and the amount of crystals formed is directly proportional to the number of cells. The process consisted in removing the cell medium and the unattached cells, then the samples were incubated with 20 vol.% MTS reagent in a RPMI 1640 medium (Roswell Park Memorial Institute) for a period of 2 h at 37 °C. The absorbance of the obtained dye was measured at 492 nm using a spectrophotometric plate reader (Infinite 1000, Tecan, North Carolina, USA).

The long-term hMSC development on the nanofibrous scaffolds was investigated after 7, 14, and 21 days with a culture medium changed twice per week. In order to assess osteogenic differentiation, both the alkaline phosphatase (ALP) activity and a staining of the generated calcium minerals were evaluated. The bone-forming ability of seeded hMSCs was first analyzed by the expression of ALP activity using alkaline phosphate yellow liquid substrate for ELISA (Sigma-Aldrich, USA). In this reaction, ALP catalyzes the hydrolysis of colorless organic phosphate ester substrate (*p*-nitrophenylphosphate, *p*-NPP), to a yellow product, *p*-nitrophenol. Briefly, scaffolds and TCPs were washed twice with PBS and immersed in 300 µL of an alkaline lysis buffer (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM and 0.1% Triton X-100) after 7, 14, and 21 days of cell culture. The samples were then scrapped, and the cell lysates underwent 3 freeze-thaw cycles

followed by a vortication for 15 s. Finally, 100 µL for the 7 day-sample and 50 µL for the 14 and 21 day-samples of each supernatant were introduced to individual wells in a 96-well plate and 100 µL of the *p*-NPP solution were added to each well. The 96-well plate was then incubated at 37 °C for 30 min, thereafter the reaction was halted by adding 100 µL of a 0.4 $mol.L^{-1}$ NaOH solution. The absorbance was then measured at 405 nm with the spectrophotometric plate reader, and the amount of the as-formed *p*-nitrophenol was determined by standard preparation in a range of concentrations from 0 to 625 $\mu ml.L^{-1}$. Analysis of each sample was performed in triplicate and ALP activity was normalized per cell thanks to DNA quantification. Using the same lysate solution, 200 µL were extracted followed by the addition of 4 µL of a proteinase K solution at a 10 $mg.mL^{-1}$ concentration. After vortication, the lysates were placed at 56 °C overnight. In order to obtain sample concentrations in the detection range of the assay, the samples were diluted by adding 400 µL of Tris-EDTA buffer, homogenized, and then 50 µL were introduced in a 96-well plate. The PicoGreen assay was performed in the dark at room temperature for 10 min with the addition of 50 µL of the PicoGreen solution. The fluorescence was measured with the Infinite 1000 plate reader using an excitation wavelength of 480 nm and an emission wavelength of 520 nm.

The hMSC calcium production could then be both qualitatively and quantitatively measured by using Alizarin Red Staining (ARS) which consists in dyeing selectively the calcium salt. In order to stain the mineral deposits, the scaffolds were rinsed twice with PBS and fixed in 70 % ethanol during 1 h at 4 °C. Then, these constructs were washed twice with deionized water and immersed in ARS (2 wt.% in deionized water at pH = 4.2) during 15 min. After 5 washes with deionized water, the scaffolds were dried overnight and observed with an optical microscope (Aristoplan, Leitz) by taking images using the CoolSnap software. The staining was then extracted by incubating the mats in a 10 % cetylpyridinium chloride solution (Sigma-Aldrich, USA) for 1 h at room temperature. Finally, 50 µL of each well was introduced in a 96-well plate, followed by the addition of 50 µL of deionized water to fit with the detection range of the spectrophotometric plate reader. The absorbance was measured at 540 nm.

SEM investigation of *in-vitro* cultured hMSCs on the scaffolds was performed after 3 h, 3 days, 6 days, and 21 days of cell culture. Prior to analyses, the scaffolds were rinsed with PBS, and fixed in a 3 wt.% glutaraldehyde solution of PBS with 500 µL per well for 30 min. After cell fixation, the scaffolds were rinsed with deionized water and dehydrated with upgrading concentrations of ethanol (50, 70, 90, 100 vol.%) for 10 min each. The specimens were then dried in 100 % HMDS and air-dried by keeping the samples in a fume hood. Finally, the scaffolds were coated with a 4-nm layer of palladium/platinum and observed using an accelerating voltage of 1 kV to analyze the hMSC morphology. The surface elemental composition of the samples was also examined by an energy-dispersive X-ray (EDX) spectroscopy with a 10 mm^2

germanium diode as an X-ray detector (lmix, Princeton Gamma-Tech) attached to the SEM equipment. EDX was thus used to detect mineralization (calcium and phosphorus) on the samples. Sample surfaces were analyzed for 5 min at 10 kV and a magnification of 1000. Spatial element mapping was performed by grouping pixels with similar atomic spectra.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Student's *t*-test for the calculation of the significance level of biological data. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Three samples per group were evaluated in cell proliferation and differentiation investigations.

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological and Physico-chemical Characterizations of Nanofibrous Scaffolds

Electrospinning has proved to be a suitable and powerful technique to engineer three-dimensional biomimetic scaffolds for tissue engineering. Such frameworks are generally characterized by a high degree of porosity and interconnected pores allowing for an efficient circulation of the elements necessary for cell development, as well as a high surface area resulting from the fiber morphology that mimic the natural ECM [9]. **Fig. 1** illustrates typical SEM images of the PHB-based fibrous materials and the PHB/GEL/nHA biocomposite scaffolds produced either from the simple electrospinning of a mixture constituted of PHB, GEL, and nHA (PHB/GEL/nHA (blend)) or from the simultaneous electrospraying of a nHA suspension with the electrospinning of a PHB/GEL mixture solution (PHB/GEL/nHA (spray)). First, the PHB, PHB/GEL, and PHB/GEL/nHA (blend) materials exhibited a porous morphology constituted of uniform and beadless fibers which were rather oriented in the collector rotation direction (**Fig. 1a-c**). Interestingly, the PHB/GEL/nHA (blend) composite fibers displayed a smooth surface with very few nanoparticles (Fig. 1k), whereas a rough surface topography was generated by the nHA covering for the PHB/GEL/nHA (spray) analogues (**Fig. 1d,h)**. It seemed that the HA nanoparticles were trapped within the PHB/GEL/nHA (blend) fibers, while the electrospinning-electrospraying combination provided fibers with a surface largely covered by the bioceramic.

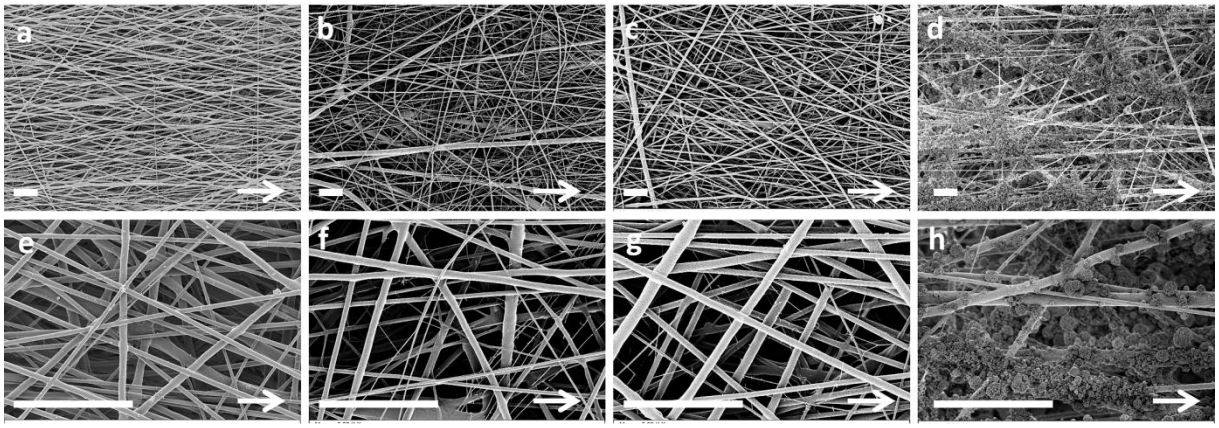


Fig. 1: SEM micrographs of electrospun fibers of (a, e) PHB, (b, f) PHB/GEL, (c, g) PHB/GEL/nHA (blend), and (d, h) PHB/GEL/nHA (spray). White bars represent a scale of 10 µm. Arrows indicate the direction of the collector rotation.

The major difference between both one-step strategies implemented, *i.e.* electrospinning of a polymer/HA mixture and electrospinning-electrospraying coupled techniques, was corroborated by TEM analyses of single fibers from biocomposite scaffolds based on PHB/GEL/nHA (blend) (**Fig. 2a,b**) and PHB/GEL/nHA (spray) (**Fig. 2c,d**). The micrographs show that the PHB/GEL/nHA (blend) framework contained a vast majority of HA nanoparticles within the constitutive fibers, while a very small amount lined the fiber surface. Interestingly, during the formation of these composite fibers, hydroxyapatite minerals were trapped within the fibers; therefore, a close contact with cells might be prevented, and the bioactivity of the bioceramic might potentially be inhibited. In this regard, **Fig. 2b** shows a loaded fiber with a higher magnification in which it is possible to distinguish a thin polymer film covering the hydroxyapatite nanoparticles located on the surface, thus possibly hindering cell/bioceramic interactions. By means of the electrospinning-electrospraying process, the nanoparticles were electrosprayed simultaneously with the formation of PHB/GEL fibers, thus leading to their deposition mainly on the surface of the as-formed fibers. **Fig. 2d** confirms one such direct deposition on the fiber surface and the absence of the polymer film observed in **Fig. 2b.** This tandem technique is expected to be the most suitable for engineering fibrous scaffolds capable of offering close interactions between cells and nHAs.

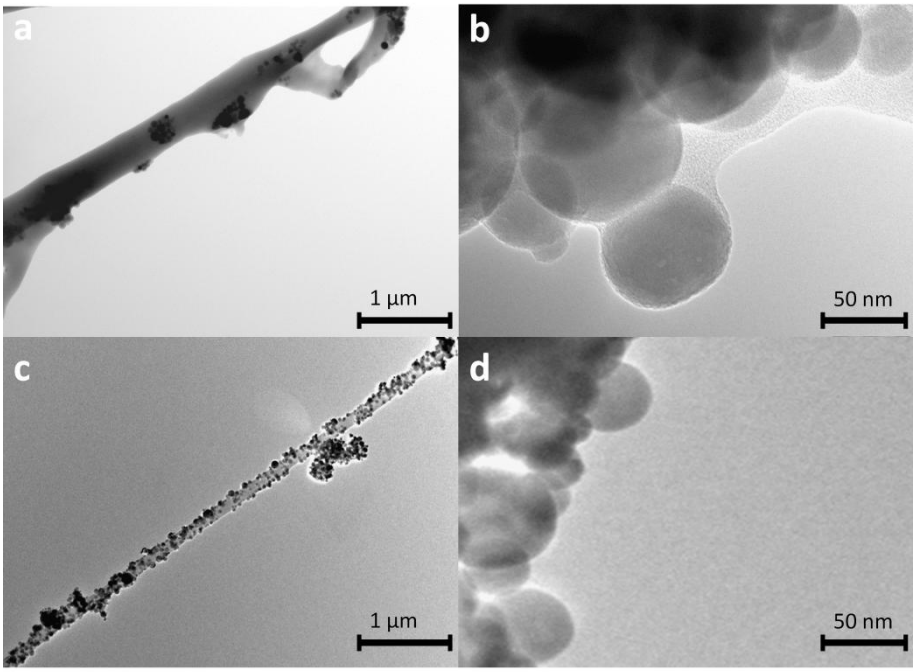


Fig. 2: TEM micrographs of single fiber from (a, b) PHB/GEL/nHA (blend) and (c, d) PHB/GEL/nHA (spray) scaffolds.

ATR-FTIR spectra (**Fig. 3**) of the fibrous materials exhibited the occurrence of PHB characteristic signals with the carbonyl stretching band at 1722 cm^{-1}, the C-O stretching band at 1055 cm^{-1}, and the -CH- bands at 2970 cm^{-1}. **Fig. 3** reveals the appearance of the characteristic bands of functional groups from gelatin with a signal at 3306 cm^{-1} typical of N-H stretching, suggesting the presence of amine functions. The amide bands of the gelatin were also observed for the gelatin-containing materials: the amide I band corresponding to C=O stretching and the amide II band corresponding to N-H bending well attested the presence of proteins similar to those encountered in bone constituents [32]. The phosphate ion (PO_4^{3-}) is a major component of HA with characteristic vibrational bands at 1018 cm^{-1} (stretching) and 569 cm^{-1} (deformation) which were observed in PHB/GEL/nHA (blend) and PHB/GEL/nHA (spray) spectra. Although SEM and TEM images illustrated the hydroxyapatite incorporation, FTIR analyses confirmed the presence of calcium-phosphate minerals in the structure of the fibrous materials, and a connection with the chemical composition of bone [32].

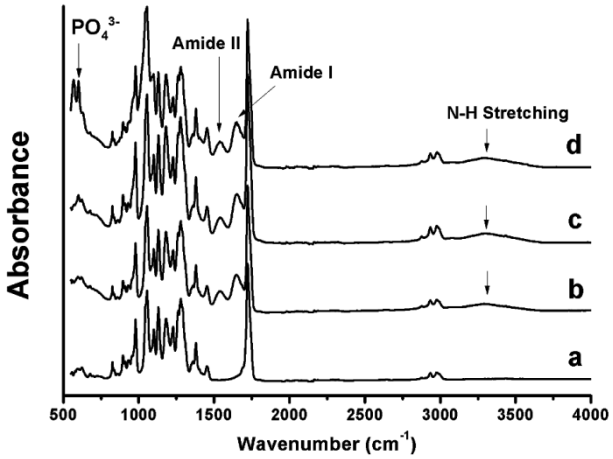


Fig. 3: ATR-FTIR spectra of (a) PHB, (b) PHB/GEL, (c) PHB/GEL/nHA (blend), and (d) PHB/GEL/nHA (spray). The spectra have been shifted vertically for the sake of clarity.

The use of trifluoroethanol as the solvent for electrospinning permitted to produce frameworks with fiber diameters lower than 500 nm, due to its relative high dielectric constant (26.14). This order of magnitude for the average fiber diameter may be particularly suitable for cell development by making nanofibrous structures similar to the morphology of the ECM, which is constituted of natural collagen fibers with diameters typically ranging from 50 to 500 nm [33]. High porosity in fibrous materials constitutes an important feature in order to enable an efficient circulation of nutrients and wastes, but also to provide enough void for the ECM regeneration [14]. Pore size ranges and porosity ratios as determined by mercury intrusion porosimetry varied from 0.4 to 8 µm and from 62 to 83 %, respectively, thus demonstrating highly porous frameworks (**Table 1**). Obtaining a lower pore size range for the PHB material could be correlated to the smaller average fiber diameter, as a decrease in the fiber diameter is generally associated with a reduction of the inter-fiber space [34]. Interestingly, the incorporation of HA nanoparticles by electrospraying led to the generation of a fibrous scaffold with higher porosity. The presence of nanoparticles that covered the fiber surface may prevent a tight layering of PHB/GEL nanofibers formed during the electrospinning process, thus generating a looser fiber organization of the scaffold with higher pore content.

Moreover, the nanofibrous structures were analyzed through contact angle measurements to determine the influence of the presence of gelatin and hydroxyapatite on the hydrophilic or hydrophobic nature of their surfaces (**Table 1**). The neat PHB nanofibers displayed a highly hydrophobic surface (θ = 119 °), while the gelatin-containing scaffolds exhibited a drastic reduction of the contact angle with a value equal to 0 °. Such a value indicated that the hydroxyl groups of gelatin were located on the external surfaces, thus

dramatically increasing the hydrophilic nature of the surfaces and leading to an immediate absorption of the water drop within the fibrous networks [15].

Table 1

Fiber diameter, pore size, porosity, and contact angle of PHB, PHB/GEL, PHB/GEL/nHA (blend), and PHB/GEL/nHA (spray) scaffolds

Scaffolds	**Average fiber diameter[a] (nm)**	**Porosity[b] (%)**	**Pore size[b] (μm)**	**Contact angle (°)**
PHB	420 ± 70	62	0.4 – 2	119 ± 3
PHB/GEL	490 ± 110	69	0.4 – 4	0
PHB/GEL/nHA (blend)	490 ± 110	71	0.4 – 4	0
PHB/GEL/nHA (spray)	480 ± 90	83	0.8 – 8	0

[a] Determined from SEM images using the ImageJ software
[b] Values as determined by mercury intrusion porosimetry

Short-term Proliferation and Morphological Evolution of hMSCs on Nanofibrous Scaffolds

Human mesenchymal stem cells (hMSCs) represent a prospective cell source for many tissue engineering applications, since they can be obtained from various origins, such as bone marrow, umbilical blood, and adipose tissues [35,36]. hMSCs have a multilineage differentiation potential leading to several specific cell types, including osteoblasts, neuron-like cells, chondrocytes or fibroblasts [37,38]. Cell development, including adhesion, deployment, and proliferation, represents the first phase of communication between hMSCs and a biomaterial, which is critical for their subsequent differentiation [39]. Moreover, the scaffold properties have a fundamental impact on the cell growth and morphology [40]. In this context, the hMSC ability to colonize the newly generated nanofibrous frameworks was investigated after 1, 3, and 6 days of culture using the MTS assay (**Fig. 4**). The results revealed a significantly higher hMSC adhesion on the tissue cultured plates (TCPs) used as control systems after 1 day, in which the 20,000 seeded cells well adhered, while the scaffolds of PHB, PHB/GEL, PHB/GEL/nHA (blend), and PHB/GEL/nHA (spray) displayed respectively 14,800, 13,900, 12,800, and 14,000 of numerated cells, which represented between 64 % and 74 % of seeded cells. Further, **Fig. 4** shows the hMSC proliferation between 1 and 3 days of culture, and this cellular process was particularly significant between 3 and 6 days of culture, with a cell number increase of 175 %,

178 %, 184 %, and 183 % for PHB, PHB/GEL, PHB/GEL/nHA (blend), and PHB/GEL/nHA (spray), respectively. Proliferation rates comparable with those for TCP supports (182 %) indicated satisfactory cell development, which proved the ability of the fibrous scaffolds to support viable cell colonization.

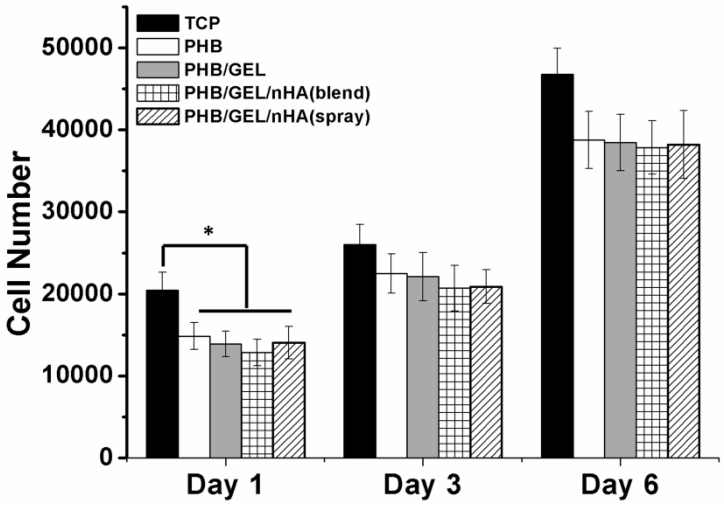


Fig. 4: MTS assay of hMSC proliferation on nanofibrous scaffolds of PHB, PHB/GEL, PHB/GEL/nHA (blend), PHB/GEL/nHA (spray) and TCPs. Bars represent mean ± standard deviation (n=3). The asterisk indicates significant difference obtained by *t*-test ($p < 0.05$).

To investigate the evolution of cell morphology on the electrospun materials, SEM analyses were performed after different periods of hMSC culture. First of all, **Fig. 5a-d** displays the low magnification of SEM images associated with several seeded cells after 3 h on the nanofibrous materials. It turned out that the adhered hMSCs on the PHB fibers exhibited a round-shape morphology (**Fig. 5a,e,i**), whereas the introduction of gelatin within the materials induced a flatter cell morphology (**Fig. 5b-d, 5f-h**). Cells began to spread and grow along the fibers (**Fig. 5h**), as well as to form contacts between them (**Fig. 5f**) on the gelatin-containing scaffolds, while the spherical morphology of cells seeded on pure PHB fibers suggested that hMSCs did not adapt to the scaffold yet (**Fig. 5e**) [41]. Accordingly, the composition of the nanofibrous structures did affect hMSC development dynamics. Polymer/natural protein hybrid scaffolds enhanced cell adaptation and development with the occurrence of filopodia only after 3 h of culture, as illustrated in **Fig. 5j,l**. In fact, gelatin possesses several integrin binding sites, thus leading to a rearrangement of the cytoskeleton structure composed of actin filaments that promote the filopodia generation. These filopodia are known to be responsible for the proper hMSC adhesion and deployment [16,42].

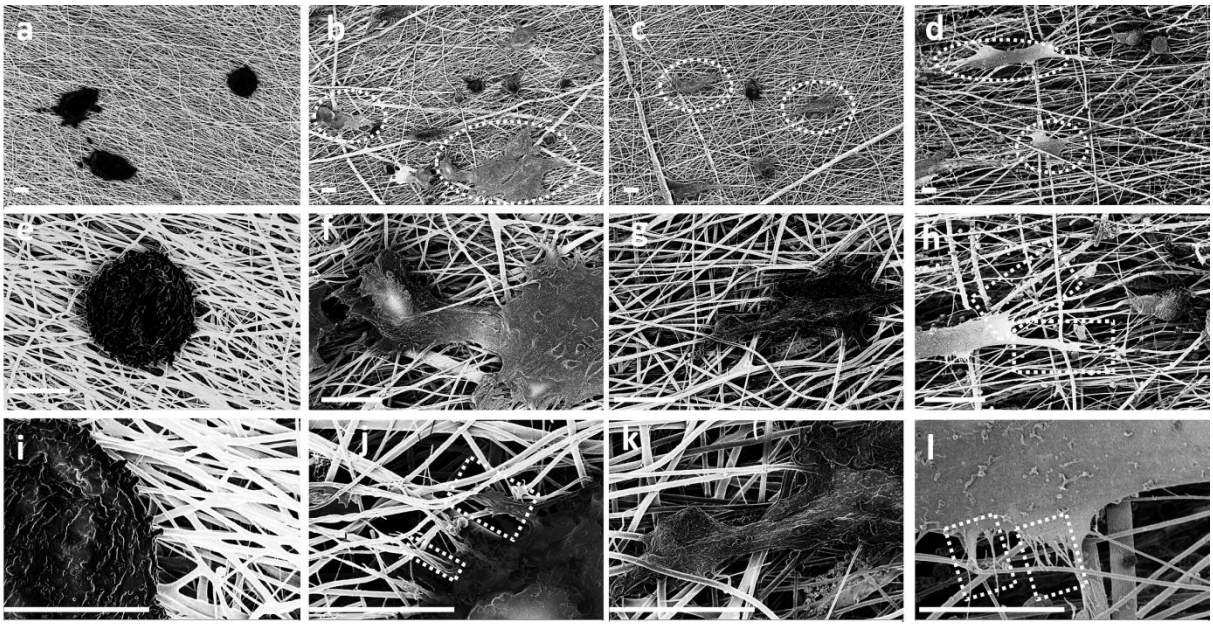


Fig. 5: SEM micrographs of nanofibrous scaffolds after 3 h of hMSC culture on (a, e, i) PHB, (b, f, j) PHB/GEL, (c, g, k) PHB/GEL/nHA (blend), and (d, h, l) PHB/GEL/nHA (spray). White bars represent a scale of 10 μm.

The hMSC morphology was then examined after 3 days of cell culture (**Fig. 6**). Interestingly, **Fig. 6a** illustrates the change of cell morphology on the PHB scaffold, *i.e.* from a spherical shape to a flattened and spread shape. The increase in the spreading surface of cells, which was also observed on the gelatin-containing scaffolds (**Fig. 6b-d**), could be attributed to a significant affinity and favorable interactions with scaffolds. It should be noted that hMSCs grew along the fibers, following the direction of the collector rotation. Moreover, the well-spread cells exhibited a strong anchorage to the materials with the occurrence of filopodia forming focal adhesions on the fiber surface (**Fig. 6e-l**). In the process of cell development, the inter-cellular communication is essential in order to exchange miscellaneous signals concerning the differentiation or other information. The generation of these communication channels was noticeable with the formation of natural ECM. Obviously enough, this ECM with spherical pores was mostly generated between two or more close cells through the production of slender cytoplasmic projection, as detected in **Fig. 6k,l**.

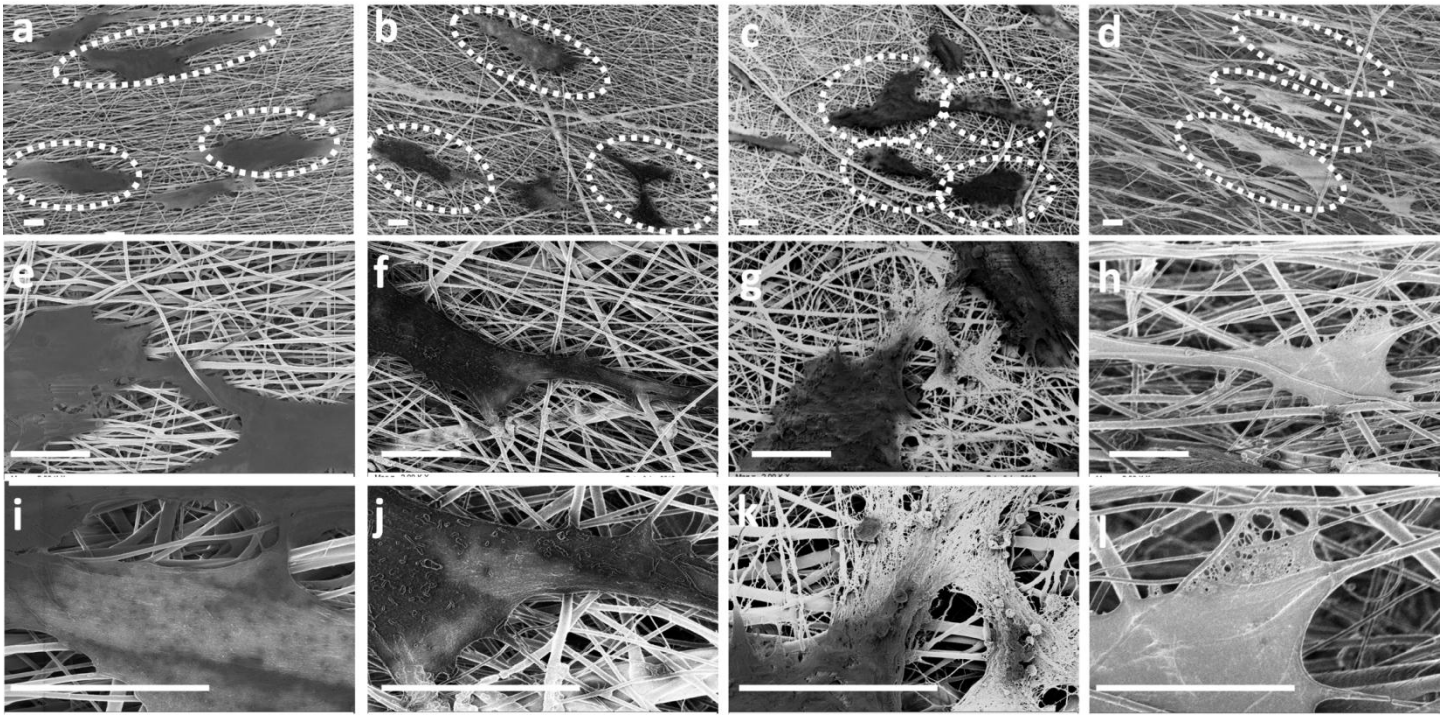


Fig. 6: SEM micrographs of with nanofibrous scaffolds after 3 days of hMSC culture on (a, e, i) PHB, (b, f, j) PHB/GEL, (c, g, k) PHB/GEL/nHA (blend), and (d, h, l) PHB/GEL/nHA (spray). White bars represent a scale of 10 µm.

After 6 days of cell culture, hMSCs were no longer independent, but formed a cell network connected by the ECM, which was an initial step toward the formation of true cellular tissue (**Fig. 7**). The spreading surface of cells increased significantly compared to that observed after the third day of cell culture (see **Fig. 6**). The spread morphology of growing cells demonstrated that they tended toward colonization of the entire scaffold surface up to reaching confluence.

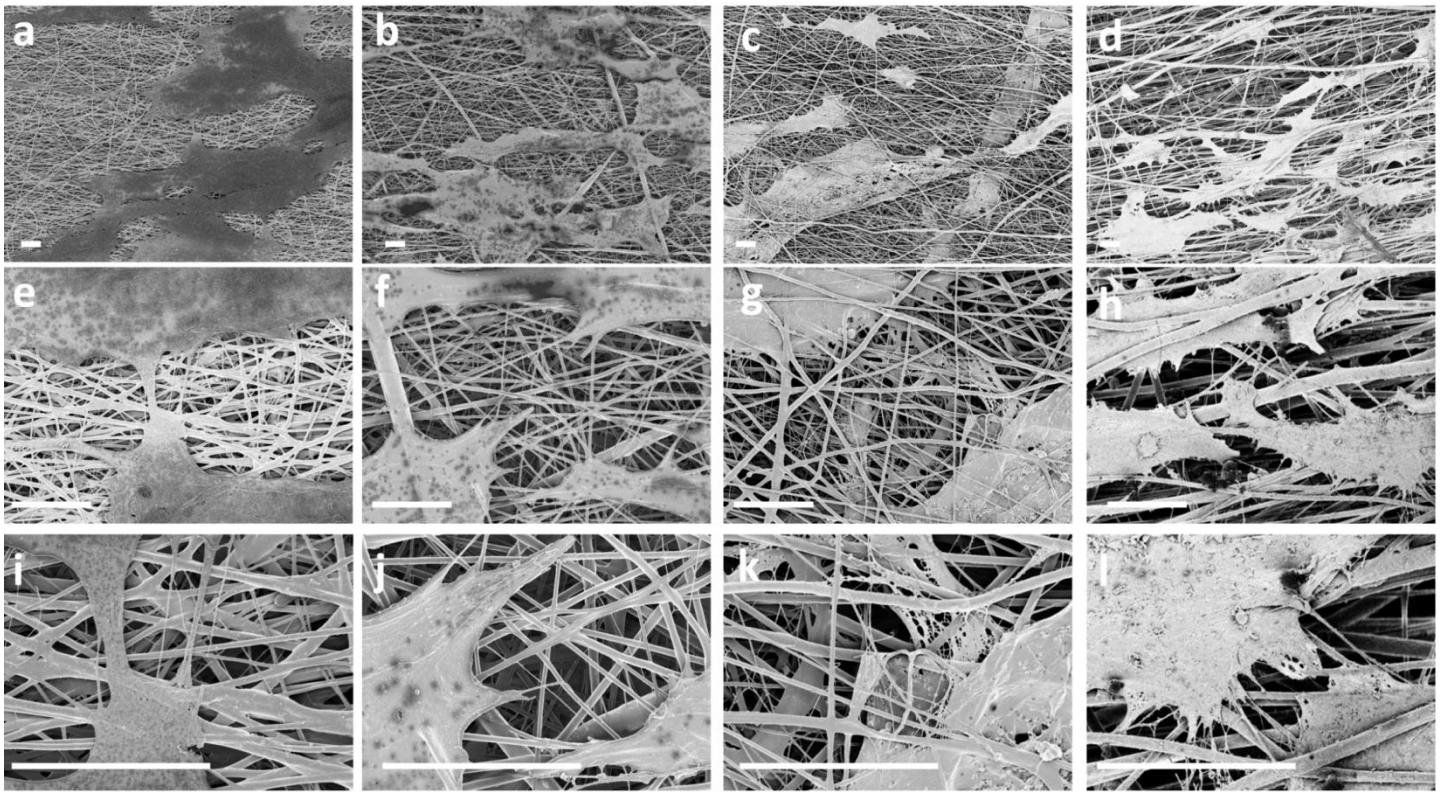


Fig.7: SEM micrographs of interaction with nanofibrous scaffolds after 6 days of hMSC culture on (a, e, i) PHB, (b, f, j) PHB/GEL, (c, g, k) PHB/GEL/nHA (blend), and (d, h, l) PHB/GEL/nHA (spray). White bars represent a scale of 10 μm.

Long-term Proliferation and Differentiation of hMSCs on Nanofibrous Scaffolds

The scaffold ability to remain stable and to support hMSC proliferation and differentiation for a long period plays a critical role in tissue regeneration. Therefore, cell proliferation was investigated after 7, 14, and 21 days of culture to assess the cell growth (**Fig. 8**). As previously observed in the short-term investigation, the MTS assay initially revealed that the cell number on the TCP control was slightly higher than those on the nanofibrous scaffolds. Similar results have previously been reported, revealing that electrospun scaffolds may hinder the first steps of cell adhesion and proliferation compared to TCPs [17,43]. This phenomenon seems to be mediated by fiber topography, which leads to a decrease in the cytoskeleton spreading and results in a slower initial development [8,44]. Nevertheless, a satisfactory cell proliferation was observed for all scaffolds between 7 and 14 days of culture with a cell confluence reached for about 120,000 cells. It should be noticed that cell proliferation was slightly slower on PHB and PHB/GEL/nHA (spray) scaffolds, with cell numbers respectively 18

% and 12 % lower than that on PHB/GEL/nHA (blend) scaffold. The lower proliferation rate on the PHB scaffold may be due to a longer adaptation stage caused by the hydrophobicity of the polyester and the absence of integrin binding sites in the polymer structure. In contrast, the reason of a slower cell proliferation on the PHB/GEL/nHA (spray) scaffold could be attributed to other factors. In fact, hMSCs seeded onto this HA-containing scaffold generated a higher ALP activity (see **Fig. 9**), which could slow down the proliferation rate. Indeed, Owen *et al.* [45] have evidenced the competition between hMSC proliferation and differentiation behaviors, revealing that the increased expression of osteoblast markers leads to a decrease in the proliferation rate.

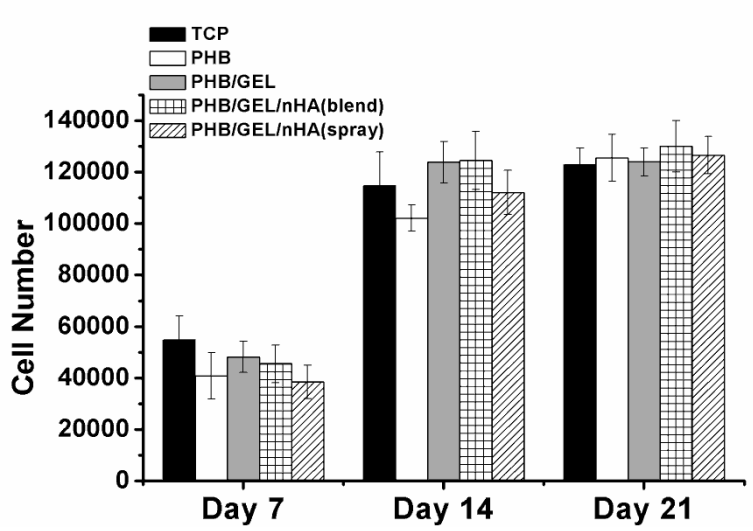


Fig. 8: MTS assay of hMSC proliferation in osteogenic media on nanofibrous scaffolds of PHB, PHB/GEL, PHB/GEL/nHA (blend), PHB/GEL/nHA (spray), and TCPs. Bars represent mean ± standard deviation (n=3).

One of the critical organic components produced during osteoblastic differentiation is the ALP enzyme, because of its activity in the formation of mineralized matrix [46]. Nevertheless, ALP is considered as an early-stage biochemical marker of immature osteoblast activity, and its transient activity was previously reported in the hMSC-induced process toward osteolineage [47]. Even though ALP can be generated in miscellaneous tissues, including liver, kidney or placenta, elevated levels are typically observed within cell metabolisms for bone regeneration, during the initial phase of mineralization [48,49]. **Fig. 9** clearly shows that the presence of gelatin stimulated osteogenic differentiation with an ALP activity evaluated over the 21-day period for the gelatin-containing scaffolds significantly higher than that for neat PHB and TCP supports. In the short-term biological investigation, we demonstrated that the presence of gelatin promoted a faster cell development (see **Fig. 5**); therefore, it turned out that the gelatin incorporation enhanced several cellular processes, such as growth and differentiation. It is

noteworthy that the ALP activity was significantly increased on the PHB/GEL/nHA (spray) scaffold with experimental results approximately 2.7, 2.0, and 1.8 times higher than those on PHB and TCP supports after 7, 14, and 21 days of cell culture, respectively (**Fig. 9**). This upregulation of ALP activity could be accounted for by an enhanced effect provided by hydroxyapatite nanoparticles which are known to induce *in-vitro* osteoblastic differentiation [20], as the sprayed nHAs on the fiber surface were in direct contact with hMSCs. No significant difference was observed between PHB/GEL and PHB/GEL/nHA (blend) nanofibrous scaffolds, which could be explained by the inclusion of nHAs within the latter fibers, thus hindering close nanoparticle/cell interactions, and potentially inhibiting the bioceramic osteoinductive properties.

Furthermore, it is noteworthy that the ALP activity of gelatin-containing scaffolds reached a maximum value after 14 days of cell culture, whereas the ALP level associated with PHB and TCP supports came to a standstill. This down-regulation or stabilization of ALP levels is considered to be related to the cellular process switching into further steps, such as mineralization [50]. In fact, the secretion of ALP as an early-stage marker decreases when the cell phenotypic shift occurs.

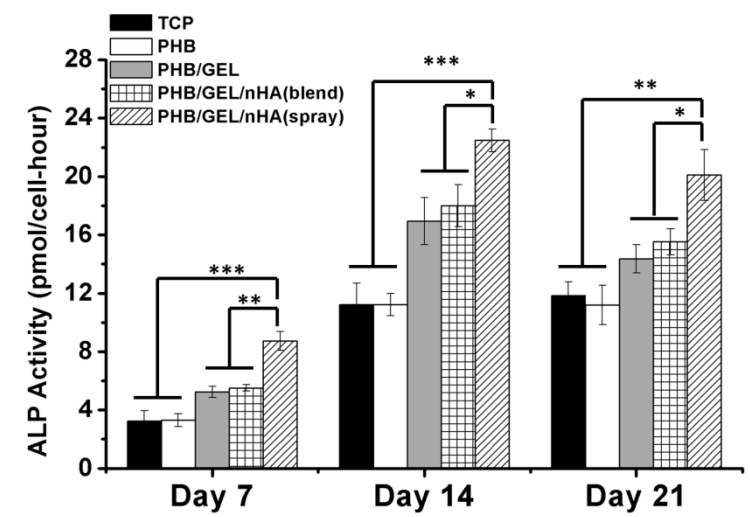


Fig. 9: Alkaline phosphatase activity of hMSCs cultured in osteogenic media on nanofibrous scaffolds of PHB, PHB/GEL, PHB/GEL/nHA (blend), PHB/GEL/nHA (spray) and TCPs. Results are normalized per cell as determined by the DNA assay (n = 3). Asterisks indicate significant difference obtained by *t*-test. (*), (**), and (***) represent respectively $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$.

Although the upregulation of ALP activity was demonstrated, the non-specific character of this biomarker toward osteogenic differentiation implies a necessary evaluation of late-stage

indicators to confirm the actual cell phenotype. Therefore, ECM mineralization was both qualitatively and quantitatively determined by using Alizarin Red Staining (ARS), as shown in **Fig. 10** and **11**. The hMSC ability to induce biomineralization is considered as an evidence of fully differentiated stem cells toward mature osteoblasts [47,51]. **Fig. 10** illustrates that the amount of minerals deposited on the scaffolds after 21 days of incubation in an osteogenic medium was higher than that observed after 14 days, which could arise from the increase in the hMSC number undergoing osteoblastic differentiation and stepping in a mineralization phase. More precisely, it is noteworthy that the calcium phosphate deposition for the PHB/GEL/nHA (spray) scaffold (**Fig. 10d,h**) was higher than that for the other scaffolds, thus confirming that the presence of nHA directly on the fiber surface enhanced hMSC differentiation.

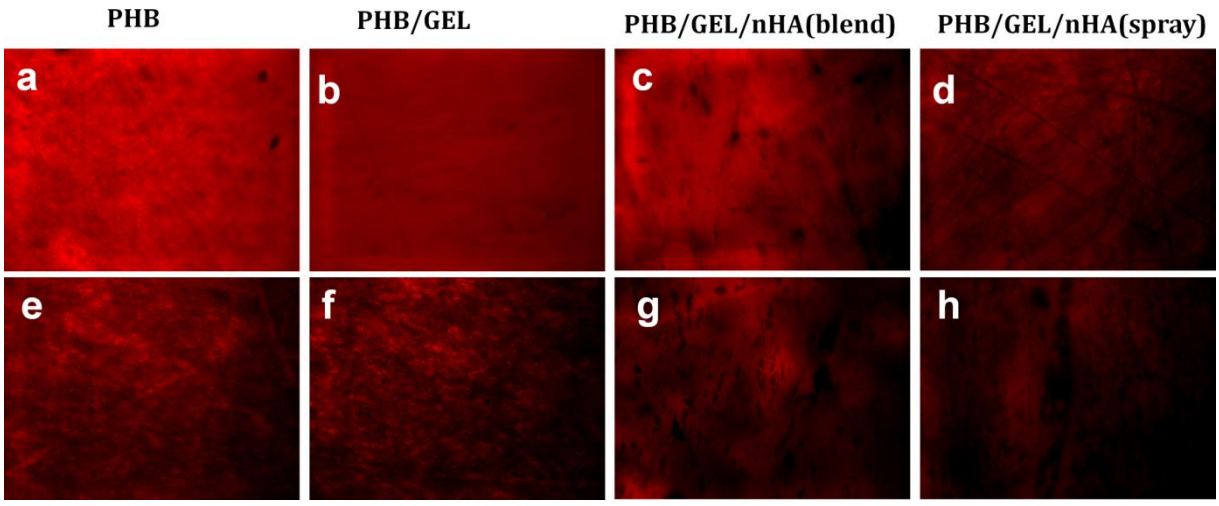


Fig. 10: Optical microscopy images for the ARS of the calcium mineralization associated with hMSCs cultured on the nanofibrous scaffolds after 14 days (a-d) and 21 days (e-h) of incubation in osteogenic media.

For a comparative quantification, the mineralized calcium content was also measured after 7, 14, and 21 days of incubation in osteogenic media (**Fig. 11**). As expected, after 7 days, there was no significant difference between the calcium content generated from hMSCs seeded on the different scaffolds and on TCPs. Higher calcium deposition values were determined after 14 and 21 days with a constant increase for all the studied scaffolds. Interestingly, the incorporation of gelatin within the fibrous architectures led to a higher mineral deposition, which could be correlated to the significantly higher ALP expression as previously shown in **Fig. 9**. More specifically, for the PHB/GEL/nHA (spray) scaffold, hMSC mineralization was significantly improved with a level roughly three times and twice as high as those found for PHB and TCP supports after 14 and 21 days, respectively. One such result was in good correlation with the qualitative images observed after ARS, as shown in **Fig. 10**. Further, compared to the

nHA-blended scaffold, higher values of calcium deposition were found for the nHA-sprayed scaffold with a significant increase of 37 % for the mineralization level. Such a result clearly demonstrated that the hydroxyapatite nanoparticles covering the fiber surface induced an enhanced effect on directing hMSCs toward the osteoblast phenotype, thus corroborating again the efficiency of the nHA electrospraying deposition process coupled to the electrospun fiber formation in order to afford direct interactions between cells and the bioceramic.

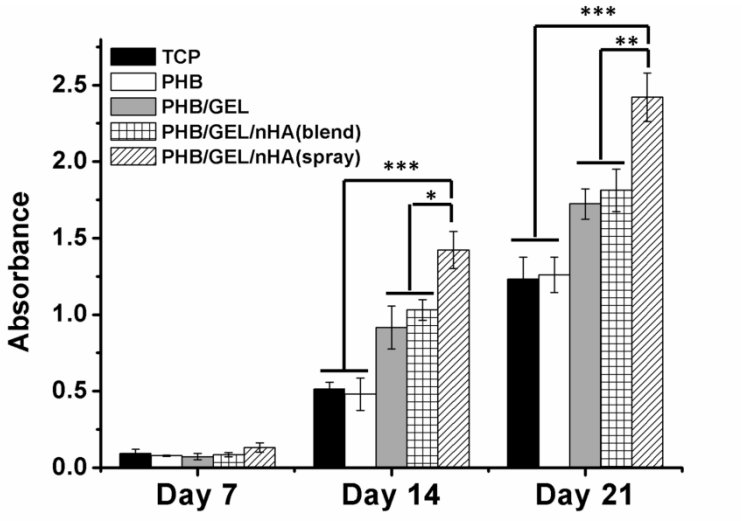


Fig. 11 : hMSCs mineralization quantification by ARS on nanofibrous scaffolds of PHB, PHB/GEL, PHB/GEL/nHA(blend), PHB/GEL/nHA(spray), and TCPs after 7, 14, and 21 days of incubation in osteogenic media (n = 3). Asterisks indicate significant difference obtained by *t*-test. (*), (**), and (***) represent respectively $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$.

After 3 weeks in osteogenic media, the cell development was observed by SEM (**Fig. 12**) in order to display cell-biomaterial interactions as well as bone matrix production. **Fig. 12** shows well-spread hMSCs with a flattened-shape morphology, thus revealing highly favorable interactions with all the scaffolds and a high cytocompatibility of the latters. Furthermore, the hMSC layers on the nanofibrous scaffolds exhibited the occurrence of filopodia which linked cells with the nanofibers, and above all generate their own direct communication channels. The cellular development tended to a complete covering of the scaffold surface with the secretion of ECM, thus indicating the hMSC confluence and the effective formation of new cellular tissue. Further, **Fig. 12e-h** illustrates that the newly formed ECM secreted several aggregations of globular bioapatite mineral accretions which were in intimate contact with cells. As previously reported [22,52], this mineral deposition occurred as the first step of osteogenesis, and therefore of bone regeneration. Noticeably, the PHB/GEL/nHA (spray) scaffold enabled the highest extent of mineral deposits with the formation of miscellaneous larger aggregates (**Fig. 12d,h**), which could be expected on the basis of the whole set of obtained results.

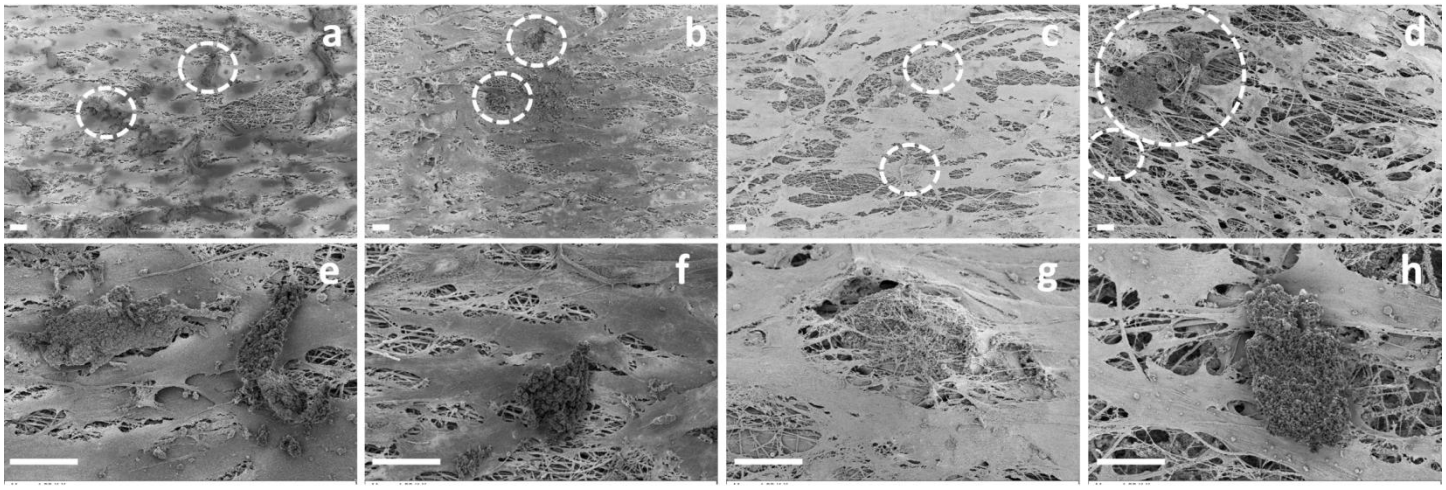


Fig. 12: SEM micrographs displaying morphology and mineralization of hMSCs after 21 days of culture in osteogenic media on (a,e) PHB, (b,f) PHB/GEL, (c,g) PHB/GEL/nHA (blend), and (d,h) PHB/GEL/nHA (spray). White bars represent a scale of 20 μm.

The evidence that such aggregates corresponded unambiguously to bioapatite secreted by the new cellular tissue was provided by EDX spectroscopic detection, as exhibited in **Fig. 13**. **Fig. 13a** represents the SEM image that included a large mineral deposit on the PHB/GEL/nHA (spray) scaffold and was scanned by EDX to determine its elemental composition. As shown in **Fig. 13b**, the EDX spectrum revealed high calcium and phosphorous peaks, thus demonstrating the substantial amounts of both elements in the analyzed area. Although EDX spectroscopy is not a suitable technique for determining calcium and phosphorous stoichiometry, due to confounding signals with the platinum/palladium coating used in SEM analyses, this spectrum clearly indicated the composition of the aggregates secreted by growing hMSCs. **Fig. 13c,d** show an elemental composition mapping for calcium and phosphorous, respectively. These mappings displayed exactly the same shape as that of the mineral deposit on the fibers (**Fig. 13a**), thus confirming its bone-like composition.

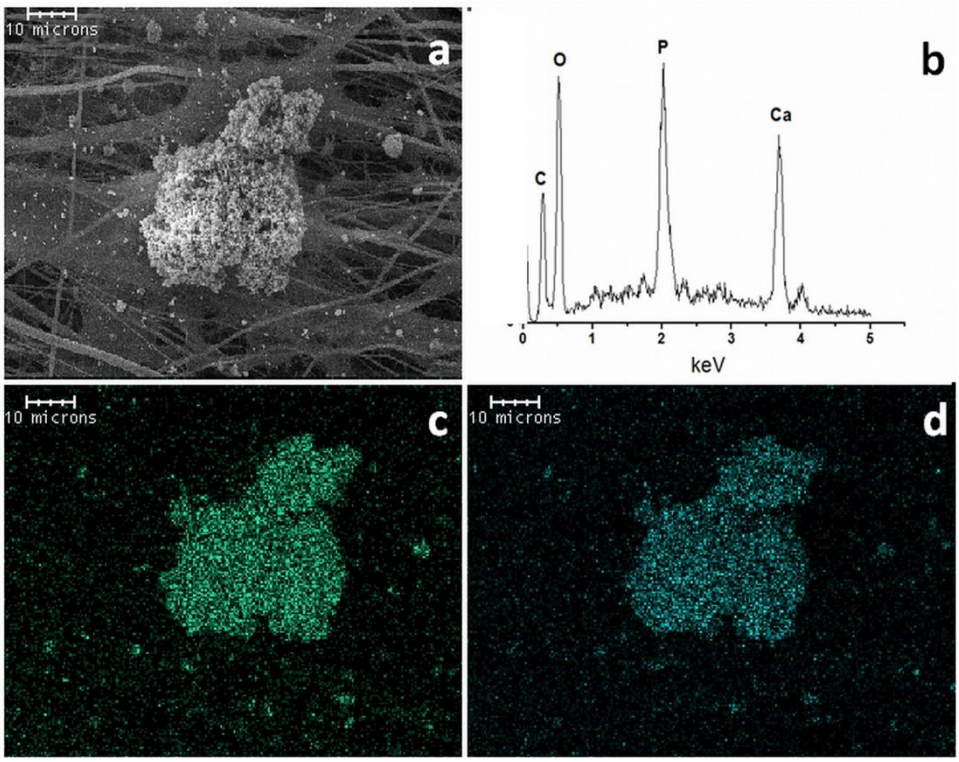


Fig. 13: (a) SEM micrograph of mineral deposits secreted by hMSCs after 21 days of osteogenic differentiation; (b) EDX spectrum showing the presence of peaks Ca and P detection; elemental mapping of mineral deposits of (c) Ca and (d) P.

This investigation demonstrated that biomimetic PHB-based nanofibrous scaffolds were suitable for cell adhesion, proliferation, and differentiation up to mineral deposit secretion. Furthermore, the ability to stimulate the osteogenic behavior of hMSCs was enhanced for the PHB/GEL/nHA (spray) scaffold with a higher level of biomineralization. The deposition of nHAs on the fiber surface by the electrospraying process permitted to transmit efficiently the bioceramic osteoinductive properties to cells, thus inducing a synergistic enhancement of the stimulatory effect of the osteogenic medium toward cell differentiation. The exact mechanism leading to the beneficial effects brought by nHAs on the differentiation is still unclear, while the bioceramic may influence the cell surface receptors which induce the activation of signaling pathways related to osteogenesis [22]. In addition, Jung *et al.* [53] have demonstrated that Ca^{2+} released from HA activates the expression of bone-associated proteins in MC3T3-E1 cells.

CONCLUSION

The present investigation describes straightforward and robust routes toward promising electrospun biocomposite scaffolds with a potentially mineralized surface for bone tissue engineering. The short-term biological investigation has shown that the scaffolds exhibit a

continuous cell proliferation with a faster evolution of cell morphology for the gelatin-containing materials. In addition, the long-term biological investigation has clearly demonstrated that hMSCs seeded onto the nHA-sprayed scaffold develop a significantly higher level of ALP activity, as well as a higher biomineralization rate compared to the other scaffolds, and especially to PHB and TCP supports. Consequently, the nHA-sprayed framework has shown its capacity for enhancing osteoblastic differentiation and its suitability for stem cell development toward bone regeneration. The fiber surface deposition of nHAs by the electrospraying process enables their direct exposure to hMSCs for an efficient transmission of the bioceramic osteoinductive and osteoconductive properties.

Accordingly, we believe that electrospinning/electrospraying-derivatized biocomposite scaffolds may facilitate hMSC colonization and the subsequent osteoblastic differentiation *in vitro* that may translate to improved bone formation, when implanted *in vivo* in tissue engineering strategies.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank the CNRS (France) and the Bulgarian Academy of Sciences (Bulgaria) for financial support through the bilateral project No. 135751. Financial support from the National Fund of Scientific Research (Grant DO 02-237/2008) is also gratefully acknowledged (J.R., O.S., N.M., and I.R.).

REFERENCES

[1] Frohlich M, Grayson W, Wan L, Marolt D, Drobnic M, Vunjak-Novakovic G. Tissue Engineered Bone Grafts: Biological Requirements, Tissue Culture and Clinical Relevance. Curr Stem Cell Res Ther. 2008;3:254-64.
[2] Conway JD. Autograft and Nonunions: Morbidity with Intramedullary Bone Graft versus Iliac Crest Bone Graft. Orthop Clin North Am. 2010;41:75-84.
[3] Grayson WL, Frohlich M, Yeager K, Bhumiratana S, Chan ME, Cannizzaro C, et al. Engineering anatomically shaped human bone grafts. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107:3299-304.
[4] Kohn D, Sander-Beuermann A. Donor-site morbidity after harvest of a bone-tendon-bone patellar tendon autograft. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 1994;2:219-23.
[5] Langer R, Vacanti J. Tissue engineering. Science. 1993;260:920-6.
[6] Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, et al. Tissue-engineered bone regeneration. Nat Biotechnol. 2000;18:959-63.
[7] Peter SJ, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG. Polymer concepts in tissue engineering. J Biomed Mater Res. 1998;43:422-7.
[8] Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: A review. Tissue Eng. 2006;12:1197-211.

[9] Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. Biomaterials. 2008;29:1989-2006.
[10] Yoo HS, Kim TG, Park TG. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. Adv Drug Delivery Rev. 2009;61:1033-42.
[11] Martins A, Duarte ARC, Faria S, Marques AP, Reis RL, Neves NM. Osteogenic induction of hBMSCs by electrospun scaffolds with dexamethasone release functionality. Biomaterials. 2010;31:5875-85.
[12] Ravichandran R, Venugopal JR, Sundarrajan S, Mukherjee S, Ramakrishna S. Precipitation of nanohydroxyapatite on PLLA/PBLG/Collagen nanofibrous structures for the differentiation of adipose derived stem cells to osteogenic lineage. Biomaterials. 2012;33:846-55.
[13] Spadaccio C, Rainer A, Centola M, Trombetta M, Chello M, Lusini M, et al. Heparin-releasing scaffold for stem cells: a differentiating device for vascular aims. Regen Med. 2010;5:645-57.
[14] Agrawal CM, Ray RB. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. J Biomed Mater Res. 2001;55:141-50.
[15] Gupta D, Venugopal J, Mitra S, Giri Dev VR, Ramakrishna S. Nanostructured biocomposite substrates by electrospinning and electrospraying for the mineralization of osteoblasts. Biomaterials. 2009;30:2085-94.
[16] Prabhakaran MP, Venugopal J, Ramakrishna S. Electrospun nanostructured scaffolds for bone tissue engineering. Acta Biomater. 2009;5:2884-93.
[17] Han I, Shim KJ, Kim JY, Im SU, Sung YK, Kim M, et al. Effect of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Nanofiber Matrices Cocultured With Hair Follicular Epithelial and Dermal Cells for Biological Wound Dressing. Artif Organs. 2007;31:801-8.
[18] Kim HW, Song JH, Kim HE. Nanofiber generation of gelatin-hydroxyapatite biomimetics for guided tissue regeneration. Adv Funct Mater. 2005;15:1988-94.
[19] Meng W, Xing Z-C, Jung K-H, Kim S-Y, Yuan J, Kang I-K, et al. Synthesis of gelatin-containing PHBV nanofiber mats for biomedical application. J Mater Sci-Mater Med. 2008;19:2799-807.
[20] Jang JH, Castano O, Kim HW. Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering. Adv Drug Delivery Rev. 2009;61:1065-83.
[21] Jose MV, Thomas V, Johnson KT, Dean DR, Nyairo E. Aligned PLGA/HA nanofibrous nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. Acta Biomater. 2009;5:305-15.
[22] Seyedjafari E, Soleimani M, Ghaemi N, Shabani I. Nanohydroxyapatite-Coated Electrospun Poly(l-lactide) Nanofibers Enhance Osteogenic Differentiation of Stem Cells and Induce Ectopic Bone Formation. Biomacromolecules. 2010;11:3118-25.
[23] Whited BM, Whitney JR, Hofmann MC, Xu Y, Rylander MN. Pre-osteoblast infiltration and differentiation in highly porous apatite-coated PLLA electrospun scaffolds. Biomaterials. 2011;32:2294-304.
[24] Francis L, Venugopal J, Prabhakaran MP, Thavasi V, Marsano E, Ramakrishna S. Simultaneous electrospin–electrosprayed biocomposite nanofibrous scaffolds for bone tissue regeneration. Acta Biomater. 2010;6:4100-9.
[25] Chen G-Q, Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. Biomaterials. 2005;26:6565-78.
[26] Misra SK, Valappil SP, Roy I, Boccaccini AR. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/Inorganic Phase Composites for Tissue Engineering Applications. Biomacromolecules. 2006;7:2249-58.
[27] Asran AS, Razghandi K, Aggarwal N, Michler GH, Groth T. Nanofibers from Blends of Polyvinyl Alcohol and Polyhydroxy Butyrate As Potential Scaffold Material for Tissue Engineering of Skin. Biomacromolecules. 2010;11:3413-21.
[28] Kuppan P, Vasanthan KS, Sundaramurthi D, Krishnan UM, Sethuraman S. Development of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Fibers for Skin Tissue Engineering: Effects of Topography, Mechanical, and Chemical Stimuli. Biomacromolecules. 2011;12:3156-65.
[29] Sombatmankhong K, Sanchavanakit N, Pavasant P, Supaphol P. Bone scaffolds from electrospun fiber mats of poly(3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and their blend. Polymer. 2007;48:1419-27.
[30] Wang Y, Gao R, Wang P-P, Jian J, Jiang X-L, Yan C, et al. The differential effects of aligned electrospun PHBHHx fibers on adipogenic and osteogenic potential of MSCs through the regulation of PPARγ signaling. Biomaterials. 2012;33:485-93.
[31] Mincheva R, Manolova N, Paneva D, Rashkov I. Preparation of Polyelectrolyte-Containing Nanofibers by Electrospinning in the Presence of a Non-Ionogenic Water-Soluble Polymer. J Bioact Compat Polym. 2005;20:419-35.
[32] Boskey A, Pleshko Camacho N. FT-IR imaging of native and tissue-engineered bone and cartilage. Biomaterials. 2007;28:2465-78.

[33] Jeong SI, Ko EK, Yum J, Jung CH, Lee YM, Shin H. Nanofibrous Poly(lactic acid)/Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Guided Tissue Regeneration. Macromol Biosci. 2008;8:328-38.
[34] Li D, Frey MW, Joo YL. Characterization of nanofibrous membranes with capillary flow porometry. J Membr Sci. 2006;286:104-14.
[35] Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. Br J Haematol. 2000;109:235-42.
[36] Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. J Cell Physiol. 2001;189:54-63.
[37] Li LF, Bai XJ, Gong XL, Liu HK, Chen LA, Guan WJ, et al. Differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells in duck. J Genetics Genomics. 2009;36:133-40.
[38] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. Science. 1999;284:143-7.
[39] Venugopal JR, Low S, Choon AT, Kumar AB, Ramakrishna S. Nanobioengineered Electrospun Composite Nanofibers and Osteoblasts for Bone Regeneration. Artif Organs. 2008;32:388-97.
[40] Beachley V, Wen X. Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. Prog Polym Sci. 2010;35:868-92.
[41] Li W-J, Danielson KG, Alexander PG, Tuan RS. Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly(ϵ-caprolactone) scaffolds. J. Biomed. Mater. Res. 2003;67A:1105-14.
[42] Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. Biomaterials. 2000;21:667-81.
[43] Prabhakaran MP, Venugopal JR, Ramakrishna S. Mesenchymal stem cell differentiation to neuronal cells on electrospun nanofibrous substrates for nerve tissue engineering. Biomaterials. 2009;30:4996-5003.
[44] Badami AS, Kreke MR, Thompson MS, Riffle JS, Goldstein AS. Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly(lactic acid) substrates. Biomaterials. 2006;27:596-606.
[45] Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. J Cell Physiol. 1990;143:420-30.
[46] Anderson HC, Sipe JB, Hessle L, Dhamyamraju R, Atti E, Camacho NP, et al. Impaired Calcification Around Matrix Vesicles of Growth Plate and Bone in Alkaline Phosphatase-Deficient Mice. Am J Pathol. 2004;164:841-7.
[47] Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. J Cell Biochem. 1997;64:295-312.
[48] Heinemann C, Heinemann S, Bernhardt A, Worch H, Hanke T. Novel Textile Chitosan Scaffolds Promote Spreading, Proliferation, and Differentiation of Osteoblasts. Biomacromolecules. 2008;9:2913-20.
[49] Liu F, Malaval L, Aubin JE. Global amplification polymerase chain reaction reveals novel transitional stages during osteoprogenitor differentiation. J Cell Sci. 2003;116:1787-96.
[50] Yu H-S, Hong S-J, Kim H-W. Surface-mineralized polymeric nanofiber for the population and osteogenic stimulation of rat bone-marrow stromal cells. Mater Chem Phys. 2009;113:873-7.
[51] Sottile V, Thomson A, McWhir J. In Vitro Osteogenic Differentiation of Human ES Cells. Cloning Stem Cells. 2003;5:149-55.
[52] Li C, Vepari C, Jin H-J, Kim HJ, Kaplan DL. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials. 2006;27:3115-24.
[53] Jung G-Y, Park Y-J, Han J-S. Effects of HA released calcium ion on osteoblast differentiation. J Mater Sci: Mater Med. 2010;21:1649-54.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette thèse a été initiée pour répondre la problématique de la régénération osseuse pré-implantaire, en proposant une alternative aux dispositifs conventionnels de greffage actuellement utilisés. Située à l'interface de la chimie macromoléculaire, de la science des matériaux et de la biologie, cette étude a couvert un large spectre de compétences et a fait appel aux nombreuses techniques propres à chaque domaine pour concevoir de nouveaux matériaux, de leur synthèse ou modification chimique jusqu'à leur mise en œuvre, et leur aptitude à être utilisés comme supports de culture cellulaire. Notre stratégie a reposé sur l'élaboration de nouveaux supports poreux à base de polymères biocompatibles et biodégradables qui doivent permettre dans une première étape, l'adhésion, la prolifération et la colonisation des cellules sur les supports avant implantation. Les matériaux élaborés doivent idéalement être ostéoinductifs, ostéoconductifs et ostéogéniques en possédant en leur sein des précurseurs ostéoblastiques pouvant se différencier en cellules osseuses matures. Au niveau de leur structure, on attend idéalement des matériaux qu'ils possèdent une forme et une taille qui permettent son intégration parfaite dans le site d'implantation, des capacités mécaniques suffisantes pour supporter les contraintes de la fonction de l'os et une résorption progressive qui n'interfère pas avec le fonctionnement normal du tissu.

Pour pouvoir répondre à ce lourd cahier des charges nous avons cherché à maîtriser l'architecture tridimensionnelle, la porosité du matériau et à contrôler la chimie de surface. Grâce à la technique du filage électrostatique (« electrospinning »), il est possible de produire des fibres de diamètre submicronique, ce qui ouvre la voie à de nouvelles avancées tout à fait intéressantes dans le domaine de la maturation des cellules *in vitro*. Les polyesters bactériens de type PHAs, dont les potentialités fondées sur la polyvalence de la bioconversion et l'apport de la modification chimique post-polymérisation ne sont plus à démontrer, ont été sélectionnés comme des polymères prometteurs dans le cadre de cette étude. Après étude des propriétés macroscopiques des solutions de filage, il a donc fallu déterminer les propriétés physico-chimiques des nanofibres de PHAs obtenues par filage électrostatique pour en comprendre toute leurs potentialités. Cette étude a reposé sur différents PHAs afin de pouvoir valider nos conclusions sur la potentialité de cette famille de polymères (PHB, PHBHV, PHBHHx, PHOU et PHAs fonctionnalisés).

Un second objectif, développé dans le deuxième chapitre, a été de développer une nouvelle approche de synthèse facile, rapide et à faible coût énergétique, qui s'insère parfaitement dans la thématique actuelle qui vise à privilégier des procédés en accord avec les principes de la chimie verte. L'efficacité du chauffage diélectrique par micro-ondes a été mise à

profit pour synthétiser des copolymères diblocs à base de PHAs et de PLA. L'intérêt de ces copolymères réside dans le fait qu'un des partenaires soit facilement hydrolysable, ce qui permet d'envisager l'élaboration de matériaux électrofilés nanofibreux dont la double porosité constitue un atout majeur dans le cadre de l'ingénierie tissulaire. Cette étude systématique a permis de confirmer la potentialité de l'activation sous micro-ondes qui peut être avantageusement utilisée dans le domaine de la chimie macromoléculaire en permettant la synthèse contrôlée de copolymères avec un gain de temps incontestable. D'autre part, cette étude a montré qu'en présence d'un contrôle rigoureux de la température de la solution et d'une agitation efficace, aucune altération de la cinétique ou du caractère contrôlé de la polymérisation n'a pu être observé, démontrant ainsi l'absence d'un effet spécifique des micro-ondes sur les réactions impliquant ce type de mécanisme.

L'activation sous micro-ondes a également été utilisée avec succès pour préparer des oligomères de PHAs à partir des polymères natifs, ce qui représente une étape cruciale dans élaboration de nouveaux matériaux à base de PHAs. En effet, la polyvalence des bactéries permet de moduler et contrôler la composition molaire des copolymères avec des rendements de synthèse plus ou moins élevés, mais aucun contrôle efficace de la masse molaire n'a été à ce jour démontré dans la littérature. La dégradation rapide et contrôlée, obtenue par chauffage sous micro-ondes, ouvre la voie à de nouvelles architectures incorporant des PHAs mais également d'autres produits issus de ressources renouvelables.

Le troisième chapitre a été consacré à l'étude systématique des conditions d'électrofilage de solutions de PHAs. Cette étude a permis de comprendre et d'établir l'importance du contrôle des paramètres physico-chimiques des solutions de polymères destinées au filage. Les résultats obtenus, après électrofilage, démontrent que le diamètre des fibres électrofilées ainsi que la morphologie poreuse, dépendent fortement du régime de concentration, de la nature du solvant et de la structure du polymère. La fonctionnalisation des supports à base de PHAs par des nanoparticules d'hydroxyapatite a été réalisée par une approche tout à fait originale combinant simultanément l' « electrospinning » et l' « electrospraying », ce qui assure une exposition optimale des nanoparticules d'hydroxapatite pour les cellules ainsi que cela a été étudié et confirmé lors d'une étude de culture *in vitro* de cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSCs).

Une fonctionnalisation chimique par réaction d'addition thiol-ène ou par greffage photochimique a également été développée et a permis de préparer des supports présentant en surface des fonctions acide carboxylique ou époxyde qui peuvent être mobilisées pour coupler des molécules pro-adhésives nécessaires pour optimiser l'activité biologique de ces nouveaux supports.

Le dernier chapitre a été consacré à l'étude plus approfondie des potentialités biologiques des nouveaux supports électrofilés à base de PHAs et fonctionnalisés avec une protéine de la matrice extracellulaire (la gélatine) et/ou des nanoparticules d'hydroxyapatite, de manière à induire la prolifération, la différentiation et la minéralisation des hMSCs en contact avec ces matériaux nanofibreux. Le point important qui a été dégagé de cette partie concerne la nécessité de la fonctionnalisation superficielle des supports, que ce soit par la présence de gélatine qui assure une développement cellulaire plus rapide ou par l'hydroxyapatite dont la présence en surface est à l'origine d'une différentiation ostéoblastique et d'une biominéralisation des hMSCs exaltée, en raison d'interactions directes entre la biocéramique et les cellules.

Les perspectives ouvertes par ce travail sont doubles. Elles se situent dans la continuité des travaux menés en collaboration avec les diverses équipes de recherches pour étendre les applications des nanofibres électrofilées étudiées, à savoir élaborer des nanofibres de porosité contrôlée à base de PHAs et fonctionnaliser les supports pour obtenir des matériaux avec un réel potentiel thérapeutique et clinique pour la régénération tissulaire. Ainsi, il serait intéressant d'étudier plus précisément des matériaux à base de PHA-*b*-PLA/gélatine fonctionnalisés par des nanoparticules d'hydroxyapatite « électrosprayées » dont la composition massique est à optimiser, compte tenu de la possibilité de réticuler la gélatine pour renforcer les propriétés mécaniques et de créer une double porosité grâce à la présence de PLA. Il s'agira de réussir à synthétiser des copolymères à blocs PHA-*b*-PLA de masses molaires élevées afin d'être compatibles avec le procédé d'« electrospinning ». L'utilisation d'oligomères dihydroxytéléchéliques de PHAs pour préparer des triblocs PLA-*b*-PHA-*b*-PLA ou de macromonomères acryliques de PLA pour générer des copolymères greffés pourraient répondre à cette problématique.

La fonctionnalisation de ces supports apparaît comme une étape incontournable pour espérer supplanter les dispositifs existants. L'approche par « grafting from » avec le méthacrylate de glycidyle ouvre la perspective de pouvoir greffer des glycosaminoglycanes (GAGs) ou des molécules biomimétiques, voire des facteurs de croissance qui pourront stimuler la prolifération, la migration et le phénotype ostéogénique de cellules souches *in vitro* en fonction de leur composition chimique.

La nature fibrillaire des mats et la fonctionnalisation orientée permet d'envisager la création d'un réseau à travers lequel les cellules peuvent se déplacer et se retrouver dans un contexte tridimensionnel équivalent à celui qu'elles connaissent *in vivo*. Le fait de disposer de matériaux pouvant constituer des modèles tridimensionnels de matrices extracellulaires capables d'induire la différentiation cellulaire *in vitro* apparaît comme un défi ambitieux dont la réussite pourrait offrir une alternative thérapeutique intéressante dans le cadre de la reconstruction tissulaire.

RESUME

Les structures poreuses tridimensionnelles fonctionnelles possèdent un fort potentiel dans de nombreuses applications biomédicales. Nous avons ainsi orienté nos travaux vers l'élaboration de nouveaux matériaux capables de répondre à plusieurs critères pour l'ingénierie tissulaire osseuse. Du fait de leur biodisponibilité, leur biocompatibilité et leur biodégradabilité, les poly(3-hydroxyalcanoate)s (PHAs) présentent des propriétés particulièrement adaptées pour ce type d'application.

Dans un premier temps, nous avons développé de nouvelles stratégies contrôlées, rapides et aisées, de synthèse de copolymères à blocs à base de PHAs ainsi que de production d'oligoesters par activation sous micro-ondes. Par ailleurs, l'absence d'effet « non-thermique » des micro-ondes sur la polymérisation par ouverture de cycles du D,L-lactide a également été démontrée grâce à une investigation systématique.

Dans un second temps, l'élaboration de divers matériaux tridimensionnels nanofibreux par électrofilage (« electrospinning ») a été réalisée afin de fabriquer des structures à base de PHAs de différentes morphologies avec la formation de fibres dans une large gamme de diamètres ou encore avec des topographies de surface contrôlées (nanopores ou rainures). Plusieurs stratégies de fonctionnalisation superficielle ont été également mises au point telles que le dépôt de nanoparticules d'hydroxyapatite selon un procédé original couplant les techniques de l' « electrospinning » et de l' « electrospraying », ou encore le « co-electrospinning » de la gélatine. De nouvelles approches de couplage covalent de molécules en surface des fibres de PHAs par chimie « click » ou par ouverture de fonctions époxyde préalablement introduites ont également été développées. Enfin, des investigations biologiques *in vitro* ont permis de mettre en lumière les potentialités de ces nouveaux matériaux nanofibreux comme supports de culture cellulaire à travers l'évaluation de l'adhérence, la prolifération et la différentiation de cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSCs) pluripotentes vers un phénotype ostéoblastique.

Mots-clés : poly(3-hydroyalcanoate)s, activation sous micro-ondes, « electrospinning », « electrospraying », hydroxyapatite, gélatine, investigations biologiques *in vitro*.

SUMMARY

Functional three-dimensional porous scaffolds possess a high potential in many biomedical applications. We have thus oriented our work toward the elaboration of new materials able to meet several criteria for bone tissue engineering. Due to their renewability, their biocompatibility, and their biodegradability, poly(3-hydroxyalkanoate)s (PHAs) exhibit properties particularly suitable for this type of application.

First, we have developed novel controlled strategies that are rapid and straightforward for the synthesis of PHA-based block copolymers as well as for the production of oligoesters upon microwave activation. Moreover, the absence of "non-thermal" microwave effect in the ring-opening polymerization of D,L-lactide was also demonstrated through a systematic investigation.

Second, the elaboration of miscellaneous three-dimensional nanofibrous materials by electrospinning has been performed to produce PHA-based frameworks with different morphologies through the formation of fibers in a wide range of diameters or with controlled surface topography (nanopores or channels). Several strategies for surface functionalization have also been implemented, such as the deposition of hydroxyapatite nanoparticles by an original combination of the electrospinning and electrospraying techniques or by the co-electrospinning of gelatin. New approaches toward covalent coupling of molecules on the PHA fiber surface by "click" chemistry or by ring-opening of previously introduced epoxide groups have also been developed. Lastly, *in-vitro* biological investigations have highlighted the potential of these new nanofibrous materials as cell culture supports through the evaluation of the adhesion, proliferation, and differentiation of pluripotent human mesenchymal stem cells (hMSCs) toward an osteoblastic phenotype.

Keywords: poly(3-hydroyalkanoate)s, microwave activation, electrospinning, electrospraying, hydroxyapatite, gelatin, *in vitro* biological investigations.