



Conception et élaboration d'échafaudages de nanofibres à dégradation contrôlée pour des applications en médecine régénératrice vasculaire

Gad Sabbatier

► To cite this version:

Gad Sabbatier. Conception et élaboration d'échafaudages de nanofibres à dégradation contrôlée pour des applications en médecine régénératrice vasculaire. Autre. Université de Haute Alsace - Mulhouse; Université Laval (Québec, Canada), 2015. Français. NNT : 2015MULH5071 . tel-01652106

HAL Id: tel-01652106

<https://theses.hal.science/tel-01652106>

Submitted on 29 Nov 2017

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.

Conception et élaboration d'échafaudages de nanofibres à dégradation contrôlée pour des applications en médecine régénératrice vasculaire

**Thèse en cotutelle
Doctorat en génie des matériaux et de la métallurgie**

Gad Sabbatier

Université Laval
Québec, Canada
Philosophiæ doctor (Ph.D.)

et

Université de Haute-Alsace
Mulhouse, France
Docteur

© Gad Sabbatier, 2015

Résumé

L'absence de croissance en monocouche des cellules endothéliales sur la paroi des prothèses vasculaires est une des causes d'échec de leur implantation chez l'humain. Des études précédentes ont montré que le recouvrement de ces prothèses par un échafaudage de nanofibres d'acide polylactique (PLA), fabriqué par un système de filage par jet d'air innovant, peut être utilisé pour promouvoir la croissance des cellules endothéliales de façon adéquate. Ainsi, le caractère dégradabile d'un matériau comme le PLA permettrait son remplacement graduel par la matrice extra-cellulaire produite par les cellules. D'autre part, la réussite d'une transition entre les nanofibres dégradables et la matrice extra-cellulaire nécessite un remplacement contrôlé et approprié. Or, la dégradation des nanofibres de PLA, dépendant de ses séquences stéréochimiques, est généralement trop longue et peut induire une cytotoxicité relative pendant sa dégradation. Dans ce contexte, les études de cette thèse ont pour objectifs de mieux comprendre la formation des fibres lors du filage, d'optimiser la fabrication des échafaudages permettant ainsi la création de nanofibres d'autres polymères, puis, de concevoir des nanofibres provenant d'un polymère mieux adapté à nos besoins, d'évaluer leur mécanisme de dégradation et sa cytotoxicité durant sa dégradation. Les travaux d'optimisation du système de filage ont démontré que la concentration avec un effet prépondérant. Ainsi, la mesure de la viscosité permet de trouver les paramètres adéquats pour le filage de polymère. Ensuite, un poly(L-lactide) semi-cristallin (PLLA) et un terpolymère de poly(lactide-co- ϵ -caprolactone) (PLCL) dédié pour des applications vasculaires ont été synthétisés et filés par jet d'air. Ces échantillons ont été dégradés en solution aqueuse et caractérisés par des méthodes physico-chimiques afin de mieux comprendre leurs mécanismes de dégradation et mis en présence de cellules endothéliales pour évaluer leur cytotoxicité. La comparaison entre les échafaudages des deux polymères a montré des comportements singuliers en dégradation, dépendants des caractéristiques thermiques des polymères. De plus, ces mécanismes de dégradation des nanofibres ont une influence directe sur la sensibilité des cellules endothéliales face aux produits de dégradation. En conclusion, ces travaux de doctorat présentent une solution prometteuse pour améliorer les prothèses vasculaires et qui pourrait être appliquée pour résoudre plusieurs problématiques en médecine régénératrice.

Abstract

The absence of neo-endothelium on the intimal surface of vascular substitutes is known to be one cause of failure upon implantation of these prostheses in humans. Previous studies have shown that the coating of these substitutes with a nanofiber scaffold, made with an innovative air spinning device, can be used to promote a suitable endothelial cells growth. On one hand, the degradable feature of material as PLA enable the progressive replacement of the scaffold by the extracellular matrix of cells. On the other hand, the success of this replacement between degradable nanofibers and the extracellular matrix requires to be appropriate and controlled. Yet, the PLA nanofiber degradation process, which depends on its stereosequences, is generally too long for this application and could involve cell sensitivity during the degradation. In this context, studies from this thesis aim to understand the fibers formation during spinning, optimizing the scaffold fabrication as well as to promote the making of novel polymer scaffolds, then, design solution to polymeric nanofiber scaffolds for vascular application, evaluate its degradation mechanism and cytotoxicity during degradation process. The work on spinning device optimisation has demonstrated that the concentration had a dominant effect. Thus, viscosity measurements enable to find suitable parameters for polymer spinning. Then, a semi-crystalline poly(L-lactide) (PLLA) and a poly(lactide-co- ϵ -caprolactone) (PLCL) terpolymer specifically made for vascular application have been synthesized and air-spun. These samples were degraded in aqueous solution and characterized by physical and chemical methods to better understand their degradation mechanisms and seeded with endothelial cells to evaluate their cytotoxicity. The comparison between the two polymers scaffolds have shown surprising degradation behaviors depending on thermal properties of polymers. Moreover, these nanofiber degradation mechanisms have a direct influence on endothelial cells sensitivity with degradation by-products. To conclude, these works of doctorate display a promising solution to improve vascular prostheses and which could be applied to solve several issues in regenerative medicine field.

Table des matières

Résumé	I
Abstract.....	III
Table des matières	V
Liste des tableaux	XI
Liste des figures.....	XIII
Liste des abréviations	XIX
Remerciements	XXV
Avant-propos	XXXI
Chapitre I. Introduction.....	1
1. Le système cardiovasculaire	1
1.1 Le sang	1
1.2 Le cœur	3
1.3 Le système circulatoire	4
2. Les vaisseaux sanguins	5
2.1 Physiologie des vaisseaux sanguins	5
2.2 Mécanique des vaisseaux sanguins	7
2.2.1 Hémodynamique	7
2.2.2 Collagène et élastine.....	8
2.2.3 Relations structure/propriété des vaisseaux sanguins	9
2.2.4 Relation structure/actions mécaniques des vaisseaux sanguins	10
2.2.5 Compréhension globale de la mécanique vasculaire	12
3. Endothélium	13
3.1 Origine embryonnaire et expression de marqueurs cellulaires	14
3.2 Interaction sang/endothélium	15
3.3 Autres influences des contraintes mécaniques sur les cellules endothéliales	15
3.4 Mécanotransduction	16
3.5 Hémostase	17
3.6 Angiogenèse post-natale	19
3.7 Cellules circulantes, microparticules et progéniteurs endothéliaux	20
4. Pathologies Vasculaires	21
4.1 Athérosclérose.....	22
4.2 Thrombose	25
4.3 Anévrisme	26
4.4 Artériosclérose et calcification.....	26
5. Substituts vasculaires	27
5.1 Angioplastie	29
5.2 Stents et endoprothèses vasculaires	29
5.3 Prothèses vasculaires biologiques	31
5.4 Prothèses vasculaires synthétiques.....	32
5.4.1 Polytétrafluoroéthylène (PTFE)	32
5.4.2 Polyéthylène téréphtalate (PET).....	34
6. Causes d'échec d'implantation	36
6.1 Réaction inflammatoire face à un biomatériau	37
6.2 Resténose des prothèses vasculaires par thrombose	40

6.3 Re-sténose des prothèses vasculaires par hyperplasie néointimale anastomotique.....	40
6.4 Faux anévrismes anastomotiques	41
6.5 Dégradation physico-chimique des prothèses vasculaires en PET.....	42
6.6 Infections postopératoires.....	43
6.7 Prothèses de petits diamètres.....	44
7. Stratégies d'amélioration des substituts vasculaires	44
7.1 Le substitut idéal	45
7.2 Le paradigme de la néoendothélialisation	47
7.2.1 Endothélialisation transanastomotique	47
7.2.2 Endothélialisation par îlots	48
7.2.3 Endothélialisation transmurale	49
7.3 Modification de surface.....	51
7.3.1 Généralités sur les traitements de surface par plasma.....	52
7.3.2 Généralités sur la polymérisation radicalaire par transfert d'atome à partir de la surface.....	53
7.3.3 Stratégie antiadhésive	53
7.3.4 Stratégie de biofonctionnalisation.....	54
7.4 Ingénierie tissulaire vasculaire	56
7.4.1 L'échafaudage	56
7.4.2 Les cellules	60
7.4.3 Les signaux	60
8. Proposition d'une solution	62
8.1 Pré-endothélialisation des prothèses vasculaires.....	62
8.1.1 Endothélialisation <i>in vitro</i> des prothèses vasculaires.....	62
8.1.2 Effet de la structure des prothèses vasculaires sur l'endothélialisation	63
8.2 Effet du recouvrement d'un échafaudage de nanofibres d'acide polylactique sur l'endothélialisation des prothèses vasculaires	65
8.3 Adhésion des nanofibres sur les structures textiles des prothèses en PET	66
9. Résumé	66
Chapitre II. Projet doctoral.....	69
1. Production de nanofibres par filage par jet d'air	70
2. Dégradation des biomatériaux.....	72
2.1 Généralités.....	72
2.2 Mécanismes et contrôle de la biodégradation des polymères.....	73
2.2.1 Mécanisme de bioérosion hydrolytique	74
2.2.2 Dégradation enzymatique	74
2.2.3 Mécanismes moléculaires et autocatalyse	75
2.2.4 Cinétique de réaction	78
3. Caractérisation et dégradation de l'acide polylactique	79
3.1 Synthèse d'acide polylactique	80
3.2 Conception de différents PLAs	81
3.3 Dégradation du PLA.....	82
4. Hypothèses, objectifs et stratégie de travail de la thèse	84
4.1 Postulat sur le contrôle de la dégradation.....	84
4.2 Objectifs de la thèse	85
4.3 Stratégie de travail.....	86
Chapitre III. Dégradation d'échafaudage de nanofibres d'acide polylactique filé par jet d'air pour l'ingénierie tissulaire vasculaire : une étude de RMN du proton.....	91

1. Résumé.....	93
2. Abstract	94
3. Introduction.....	95
4. Materials and Methods.....	97
4.1 Materials	97
4.2 Methods.....	97
4.2.1 Air spinning process condition	97
4.2.2 Sample preparation.....	98
4.2.3 NMR measurements	98
4.2.4 PLA molecular weight.....	98
4.2.5 Stereosequence evolution determination	99
5. Results and discussion	100
5.1 Spectral identification and PLA characterisation.....	100
5.2 Global degradation of the PLA	103
5.3 The role of stereosequence and isomer ratios in PLA degradation.....	105
6. Conclusion	108
7. Acknowledgements.....	109

Chapitre IV. Évaluation d'un système de filage par jet d'air pour produire des échafaudages de nanofibres biosynthétiques optimisés

1. Résumé.....	113
2. Abstract	114
3. Graphical Abstract	114
4. Introduction.....	115
5. Materials and methods	117
5.1 Air spinning process and parameters	117
5.2 Morphology study and fibre diameter measurements	119
5.3 Experimental design and statistical analysis	119
5.4 Viscosity measurements.....	121
6. Results.....	121
6.1 Morphology study	121
6.2 Diameter measurements	123
6.3 Experimental designs	124
6.4 Viscosity results	127
7. Discussion.....	128
8. Conclusion	132
9. Acknowledgements.....	132
10. Supplementary data.....	133

Chapitre V. Conception, mécanisme de dégradation et cytotoxicité à long terme de films et de nanofibres filées par jet d'air de poly(L-lactide) et de poly(L-lactide-co-ε-caprolactone)

135

1. Résumé.....	137
2. Abstract	137
3. Highlights.....	138
4. Graphical abstract	139
5. Introduction.....	141

6. Experimental section	144
6.1 Materials synthesis	144
6.2 Films and nanofibers	144
6.3 Polymer degradation procedures	145
6.4 Molecular characterization of synthesized PLCL	146
6.5 Characterization of polymer films before degradation.....	147
6.6 Physical and chemical characterization during degradation	148
6.7 HSVEC isolation and culture	150
6.8 Preparation of samples for HSVEC seeding, sanitization and pH measurements.....	150
6.9 HSVECs adhesion and proliferation experiments in function of degradation	151
7. Results	152
7.1 Initial characterization of PLCL and PLLA	152
7.2 GPC and mass measurement results versus degradation time.....	154
7.3 Thermal analysis versus degradation time	158
7.4 Morphology of samples as a function of degradation time	161
7.5 pH measurements	166
7.6 HSVEC adhesion and expansion before degradation.....	167
7.7 HSVEC response to degradation products	169
8. Discussion	172
8.1 Design of PLLA and PLCL terpolymer air-spun nanofibers	172
8.2 Degradation mechanisms	175
8.3 Long-term cytotoxicity.....	181
9. Conclusion.....	183
10. Acknowledgements	183
11. Supporting information	184
Chapitre VI. Discussion générale.....	189
1. Discussion	189
1.1 Dégradation de nanofibres de PLAs commerciaux	189
1.2 Optimisation du filage par jet d'air pour la fabrication de nanofibres de polymères ...	191
1.3 Compréhension de la formation des fibres lors du filage par jet d'air	193
1.4 Evolution du système de filage par jet d'air.....	194
1.5 Conception d'un polymère spécifique à dégradation contrôlée	196
1.6 Dégradation accélérée du PLLA : avantages et limites.....	197
1.7 Compréhension de la dégradation des nanofibres	198
1.8 Dégradation et cytotoxicité	200
1.9 Fonctionnalisation de la surface des nanofibres	201
1.10 Adhésion des nanofibres sur les surfaces textiles.....	202
2. Limites et Perspectives.....	202
2.1 Amélioration de la technique de filage par jet d'air	203
2.2 Fabrication d'échafaudage à porosité contrôlée	204
2.3 Polymères à dégradation contrôlée pour la génération tissulaire vasculaire	205
2.4 Créer des nanofibres dégradables et fonctionnalisées	206
2.5 Interactions cellules/ matériaux.....	207
2.6 Essais en chambre de flux	208
2.7 Endothélialisation <i>In situ</i> ou <i>In vitro</i>	209
2.8 Implantation	210
2.9 Vers d'autres applications	211

Conclusion générale.....	213
Bibliographie	215
Annexe I. Nanofibres de PLA filées par jet d'air modifiées possédant une surface hydrophile clivable par réduction pour le génie tissulaire vasculaire : synthèse et modification de surface.....	265
1. Résumé.....	267
2. Abstract.....	267
3. Graphic abstract	268
4. Introduction.....	269
5. Results and Discussion	272
6. Conclusion	279
7. Acknowledgments	279
8. Supporting information.....	280
8.1 Experimental	280
Annexe II. Analyse de la cristallinité des nanofibres de PLA par calorimétrie différentielle à balayage en modulation stochastique de température.....	289
1. Introduction.....	289
2. Matériels et méthodes	291
2.1 Fabrication des nanofibres de PLA	291
2.2 Mesures en DSC et TOPEM [®] -DSC	292
2.3 Stratégie d'optimisation des mesures en TOPEM [®] -DSC.....	292
2.4 Calculs des propriétés thermiques en DSC et TOPEM [®] -DSC.....	294
3. Résultats et discussion	294
3.1 Résultats en DSC	294
3.2 Optimisation des mesures de TOPEM [®] -DSC	296
3.3 Analyse des courbes de TOPEM [®] -DSC des nanofibres de PLA	298
4. Conclusion et perspectives.....	300
Annexe III. Analyse de la cristallinité des nanofibres de PLA par diffraction des rayons X	301
1. Introduction.....	301
2. Matériels et méthodes	302
3. Résultats et discussion	303
4. Conclusion	306
Annexe IV. Analyse des nanofibres de PLA par spectroscopie vibrationnelle	307
1. Introduction.....	307
2. Matériels et méthodes	308
3. Résultats et discussion	309
4. Conclusion	313
Annexe V. Amélioration de l'adhésion des nanofibres sur la surface des prothèses vasculaires	315
1. Introduction.....	315

2. Matériels et méthodes.....	316
2.1 Matériels.....	316
2.2 Modification de la surface des prothèses et caractérisation	316
2.3 Caractérisation du recouvrement de nanofibres sur les prothèses vasculaires	318
2.4 Caractérisation de l'adhésion des nanofibres sur la surface des prothèses.....	318
3. Résultats	321
3.1 Modification de la surface des prothèses	321
3.2 Caractérisation du recouvrement de nanofibres	325
3.3 Caractérisation de l'adhésion des nanofibres sur la surface des prothèses vasculaires	325
4. Conclusion et perspectives	327

Liste des tableaux

Table 1. Composition of PLA1 and PLA2 before hydrolysis

Table 2 : Experimental designs

Table 3: Informations supplémentaires du chapitre IV : correlation coefficients on average nanofiber diameter calculation (Y)

Table 4: List of sample groups

Table 5: Characteristics of PLLA and PLCL

Table 6: pH measurements in water and in M199 medium

Table 7: Characteristics and molecular weight data of PLA-ss-POEOMA BCPs synthesized by chain extension of PLA-ss-Br fibers with POEOMA under normal ATRP conditions.

Table 8: Characteristics and molecular weight data of PLA-ss-Br homopolymers synthesized by ROP of LA in the presence of HO-ss-Br in toluene at 120 °C under different conditions.

Tableau 9 : Conditions de mesures en TOPEM[®]-DSC

Tableau 10 : Propriétés thermiques des nanofibres de PLA1, PLA2 et PLLA mesurées en DSC et TOPEM[®]-DSC

Liste des figures

Figure 1. Cellules sanguines au microscope électronique à balayage [5]

Figure 2. Le système artériel (adaptée de [8])

Figure 3. Différentes couches d'une artère (adaptée de [14])

Figure 4. **a.** Composition et caractéristiques structurales des vaisseaux sanguins (adaptée de [8]) ; **b.** Courbes contrainte-déformation longitudinale et transversale d'artères élastiques (adaptée de [19]); **c.** Courbes contrainte-déformation longitudinale et transversale d'artères musculaires (adaptée de [19])

Figure 5. Pression sanguine, surface du lit vasculaire et vitesse de sang (adaptée de [8])

Figure 6. Hémostasie. **a.** Fonctionnement normal. **b.** Hémostasie primaire/coagulation plasmatique **c.** Inhibition de la coagulation/fibrinolyse

Figure 7. Les 10 premières causes de décès à l'échelle mondiale en 2012. (adaptée de [46]).

Figure 8. Évolution de l'athérosclérose (adaptée de [47])

Figure 9. Distribution des plaques d'athérosclérose chez l'humain (adaptée de [48])

Figure 10. Anévrisme de l'aorte abdominale [49]

Figure 11. Progression de l'occlusion artérielle en fonction du traitement approprié (adaptée de [50])

Figure 12. Description de l'angioplastie avec pose de stent

Figure 13. Structure des prothèses en ePTFE, **a.** Prothèse en ePTFE [60], **b.** Observation d'une coupe transversale d'une prothèse de ePTFE au microscope électronique à balayage [67]

Figure 14. **a.** Surface interne d'une prothèse vasculaire en PET tricotée avec effet velours, **b.** Surface interne d'une prothèse vasculaire en PET tricotée (grossissement inconnu) [60]

Figure 15. Réaction inflammatoire à un biomatériau, **a.** Variation temporelle de la réponse inflammatoire aiguë, chronique, de la formation d'un tissu de granulation et de la réaction à un corps étranger (adaptée de [76]), **b.** Réaction normale à un corps étranger (adaptée de [77]).

Figure 16. Hyperplasie intimale sur une prothèse en PET couverte de gélatine (a), une prothèse en PET couverte d'un polymère fluoré (b), une prothèse en PET plus récente couverte d'un polymère fluoré (c), une prothèse en ePTFE (d), une prothèse en ePTFE couverte de carbone (e), une prothèse en PU (f) [84]

Figure 17. Faux anévrisme anastomotique [49]

Figure 18. Dégradation des prothèses vasculaires **a.** Atténuation du cosselage après vieillissement mécanique *in vitro* [86] **b.** Rupture longitudinale d'un explant et perte du cosselage après 12 ans d'implantation [88]

Figure 19. Cas d'implantation d'une prothèse en PET tricotée avec velours externe par pontage auxiliaire gauche-fémorale bilatérales (A) et ses zones endothélialisées (B) (adaptée de [100])

Figure 20. Mécanismes d'endothélialisation des prothèses vasculaires observés chez le singe, **a.** Endothélialisation transanastomotique pour des prothèses à faible porosité, **b.** Endothélialisation transluminale pour des prothèses à grande porosité. (adaptée de [98])

Figure 21. Endothélialisation *in situ* (adaptée de [127])

Figure 22. Stratégie d'ensemencement d'échafaudage pour la création de vaisseaux sanguins par ingénierie tissulaire (adaptée de [50])

Figure 23. Concept de remodelage artériel dans un échafaudage dégradable ensemencé par des cellules souches (adaptée de [148])

Figure 24. Structures textiles de prothèses vasculaires (filaments noirs) avec des cellules endothéliales photographiées au microscope à fluorescence après 5 jours de prolifération. Les filaments d'actine et les noyaux des cellules sont respectivement marqués à la rhodamine-phalloïdine (couleur rouge rosée) et au DAPI (couleur bleue). A : prothèse tissée avec effet velours (Biomateriali[®]) ; B : prothèse tricotée avec effet velours (Biomateriali[®]) ; C : prothèse tissée (Cardial[®]) ; D : prothèse tricotée (Cardial[®]) [158].

Figure 25. Images en microscopie à fluorescence des cellules endothéliales marquée à la rhodamine/ phalloïdine (filament d'actine) et au DAPI (noyaux des cellules). A : film de PET ; B : Prothèse tissée Cardial ; C : Prothèse tissée recouverte de nanofibres (vert) [159].

Figure 26. Hydrolyse d'un ester

Figure 27. Mécanismes de bioérosion des matériaux. **a.** Érosion surfacique, **b.** Érosion volumique, **c.** Érosion volumique autocatalysée, **d.** Érosion enzymatique, **e.** Épaisseur critique (adaptée de [169–171,175])

Figure 28. Différentes voies de polymérisation de l'acide polylactique (adaptée de [179])

Figure 29. Lactide and PLA forms

Figure 30. PLA1 and PLA2 ¹H-NMR spectra ($\delta = 4-6$ ppm) at 0 days

Figure 31. Homonuclear decoupled ¹H NMR spectrum of the methine region ($\delta = 5.13-5.25$ ppm) and stereosequence identification.

Figure 32. PLA degradation process followed by ¹H-NMR spectroscopy after 90 days of hydrolysis in physiological serum

Figure 33. Hydrolysis kinetics, following by ¹H-NMR spectroscopy, for PLA1 (a) and PLA2 (b)

Figure 34. Evolutions of isotactic block (iii) for PLA1 (a) and PLA2 (b) and of stereoblocks (isi) for PLA1 (c) and PLA2 (d).

Figure 35. Evolution of the amount of LL unit for PLA1 (a) and PLA2 (b) calculated with a Monte Carlo simulation.

Figure 36. Résumé graphique du chapitre IV

Figure 37. Air spinning system set-up. (1) syringe pump; (2) compressed air tank; (3) air valve; (4) manometer; (5) atomiser; (6) injector with small needle; (7) nozzle; (8) pulverisation cone; (9) XY translation stage and collector; and (10) Z-stage.

Figure 38. Air spun nanofibre scaffold morphologies. (a) bead inside the scaffold; (b) nanofibre scaffold; (c) puddle of PLA polymer; (d) functioning chart, (e) surface ratio using a 0.25 mm-diameter needle.

Figure 39. Typical distribution of nanofibre diameter.

Figure 40. Confident intervals for regression coefficients and model Equations (X_C : solution concentration, X_D : needle diameter, X_F : flow rate, X_P : pressure, a X with two subscript letters shows an interaction between two parameters (e.g $X_{CD} = X_C.X_D$)).

Figure 41. Specific viscosity of PLA solutions as a function of polymer concentration

Figure 42. Résumé graphique du chapitre V

Figure 43. GPC measurement results, (a) Molecular weight as a function of the degradation time and (b) Half-life degradation times

Figure 44. Mass measurements results, (a) Remaining weight and (b) Water absorption as a function of the degradation time at 37°C in PBS.

Figure 45. DSC thermograms of PLLA film samples degraded at 37°C (a), PLLA fiber samples degraded at 37°C (b), PLLA film samples degraded at 50°C (c), PLLA fiber samples degraded at 50°C (d) and Tg and Xc of PLLA samples (e).

Figure 46. DSC thermograms of PLCL fiber samples degraded at 37°C

Figure 47. SEM images showing the evolution of PLLA nanofibers structure with accelerated degradation at 50°C, PLLA nanofiber scaffold before degradation (5000x) (a), PLLA nanofiber scaffold at day 35 (5000x) (b), PLLA nanofiber scaffold at day 70 (200x) (c), PLLA nanofiber scaffold at day 70 (5000x) (d), PLLA nanofiber scaffold at day 120 (200x) (e), PLLA nanofiber scaffold at day 120 (15000x) (f), Lognormal fitting of fiber diameter distribution (g). R^2 is the correlation factor between the fiber diameter distribution and the log-normal function and S is the shape parameter.

Figure 48. SEM images showing the evolution of PLCL nanofiber structures with degradation at 37°C, PLCL nanofiber scaffold before degradation (10000x) (a), PLCL nanofiber scaffold at day 3 (5000x) (b), PLCL nanofiber scaffold at day 35 (200x) (c), PLCL nanofiber scaffold at day 35 (5000x) (d), PLCL nanofiber scaffold at day 70 (200x) (e), PLCL nanofiber scaffold at day 70 (5000x) (f), Log-normal fitting of fiber diameter distribution (g). R^2 is the correlation factor between the fiber diameter distribution and the log-normal function and S is the shape parameter.

Figure 49. Adhesion (a) and expansion (b) of HSVEC before the degradation process (day 0). * = significant difference ($p < 0.05$) as compared to the PP treated well according to Kruskal-Wallis ANOVA test. ** = significant difference ($p < 0.05$) as compared to a gelatinized well.

Figure 50. HSVEC response to sample degradation products after 35 days (a), 70 days (b) and 120 days (c) of degradation. The temperature and the mass to volume ratio correspond respectively to the degradation temperature and the fiber concentration in water during the degradation. * = significant difference ($p < 0.05$) as compared to the PP treated well according to Kruskal-Wallis ANOVA test.

Figure 51. ^1H NMR spectrum of PLCL. $\delta_{\text{LA}}=5.15$ (lactide methine), $\delta_{\epsilon}=4.1$ (ϵ -methylene of ϵ -caprolactone) and $\delta_{\alpha}=2.35$ (α -methylene of ϵ -caprolactone).

Figure 52. GPC chromatogram of PLCL (a) and PLLA (b) nanofibers degraded at 37°C

Figure 53. Bacterial and fungus culture before and after sanitization of sample with penicillin-streptomycin, control sample (a), PLLA film without sanitization (b), PLLA film with sanitization (c) PLLA nanofibers without sanitization (d), PLLA nanofibers with sanitization (e), PLCL film without sanitization (f), PLCL film with sanitization (g), PLCL nanofibers without sanitization (h), PLCL nanofibers with sanitization (i).

Figure 54. Système de filage par jet d'air et module de pulvérisation dans des prothèses vasculaires

Figure 55. Échafaudage tubulaire de nanofibres

Figure 56. Résumé graphique de l'annexe I

Figure 57. Illustration of our approach to synthesize reductively-sheddable POEOMA-g-PLA fibers based on PLA-ss-POEOMA block copolymers having disulfides at block junctions using surface-initiated atom transfer radical polymerization of OEOMA in the presence of PLA-ss-Br fibrous macroinitiators and their degradation in response to reductive reactions.

Figure 58. SEM images of PLA-9 fibers ($M_n = 75.6$ kg/mol) (A, C) and POEOMA-g-PLA BCP-3/fibers (B, D) with lower (A, B) and higher (C, D) magnitudes.

Figure 59. ^1H -NMR spectra of PLA-9 (A), BCP-1 (B), and BCP-3/fibers (C) in CDCl_3 .

Figure 60. Evolution of contact angle on PLA fibers, POEOMA-g-PLA fibers before and after treatment with DTT (A), and snapshots of water droplets on POEOMA-g-PLA fibers after SI-ATRP (B) and PLA-ss-Br fibers in the pristine state (C). Inset of (A): evolution of contact angle on PLA fibers and POEOMA-g-PLA fibers before DTT treatment.

Figure 61. GPC traces of PLA-1 ($M_n = 27.6$ kg/mol), PLA-6 ($M_n = 35.0$ kg/mol), and PLA-9 ($M_n = 75.6$ kg/mol).

Figure 62. Evolution of molecular weights and HMS contents over polymerization time for ROP of LA with targeting DP = 500 and 1000, as summarized in Table 8.

Figure 63. SEM images of low molecular weight PLA-1 ($M_n = 27.6$ kg/mol) (A, C) and PLA-6 ($M_n = 35.0$ kg/mol) (B, D) at lower (A, B) and higher (C, D) magnitudes.

Figure 64. Size distribution in diameter of nanofibers of PLA-ss-Br and POEOMA-g-PLA fibers.

Figure 65. ^1H -NMR spectrum of PLA-ss-POEOMA BCP-2 in CDCl_3 .

Figure 66. GPC traces of PLA-ss-Br fibers and PLA-ss-POEOMA300 (BCP-1) in DMF.

Figure 67. GPC traces of PLA-ss-Br fibers and POEOMA-g-PLA fibers based on PLA-ss-POEOMA950 (BCP-3/fibers) in DMF.

Figure 68. TGA diagrams of PLA-ss-Br fibers, BCP-3/fibers, and PEOH with MW = 2,000 g/mol for comparison. An arrow indicates a temperature where the major weight loss starts.

Figure 69. Reductive degradation of POEOMA-g-PLA fibers in DMF homogeneous solution monitored by GPC traces.

Figure 70. ^1H -NMR spectra of BCP-3/fibers in the absence (a) and presence (b) of excess DTT in water, compared with the spectrum of pristine PLA-ss-Br fibers (c) in CDCl_3 .

Figure 71. Vitesse de chauffe (bleu) et flux de chaleur (rouge). La largeur de fenêtre est de 180 s et le décalage est de 40 s.

Figure 72. Fonction de transfert du calcul de l'évaluation TOPEM. $E(t)$ est le flux de chaleur mesuré par la DSC. $S(t)$ est le flux de chaleur total calculé par l'évaluation TOPEM. La fonction $g(t)$ correspond au calcul fait par le logiciel dépendant de W . $\varepsilon(t) = S(t) - E(t)$

Figure 73. Premier cycle de chauffe des PLA1 et PLA2 sous forme de granulés (brut) et nanofibres

Figure 74. Thermogrammes de TOPEM[®]-DSC représentant les flux de chaleurs réversible (a) et non-réversible (b) en fonction de W

Figure 75. $E(t)$, $S(t)$ et $\varepsilon(t)$ pour les nanofibres de PLA2 avec $W = 320$ s (a). Somme des amplitudes calculées à partir de $\varepsilon(t)$ en fonction de la largeur de la fenêtre de calcul pour les nanofibres de PLA1, PLA2 et PLLA (b).

Figure 76. Thermogrammes réversibles (a) et non-réversibles (b) en TOPEM[®]-DSC des nanofibres de PLA1, PLA2 et PLLA

Figure 77. Cristallisation des nanofibres de PLA1 et PLA2. 1a : diffractogramme de XRD et thermogramme de DSC des nanofibres de PLA1, 1b : diffractogramme de XRD et thermogramme de DSC des nanofibres de PLA2

Figure 78. Pic de diffraction X suivant la direction (200/110) et thermogrammes de DSC pour les granulés de PLA1 (a), les nanofibres de PLA1 (b), les granulés de PLA2 (c) et les nanofibres de PLA2 (d).

Figure 79. Spectres ATR-FTIR des nanofibres de PLA1 entre 1690cm^{-1} et 1810cm^{-1} (a) et 750cm^{-1} et 1550cm^{-1} (b)

Figure 80. Pics d'étirement du carbonyle et ses dérivées secondes en fonction de la température des nanofibres de PLA1 (a ; b), de PLA2 (c ; d) et de PLLA (e ; f). Pic 1 : conformation gauche-gauche (gg), pic 2 : conformation trans-gauche (tg), pic 3 : conformation gauche-trans (gt), pic 4 : conformation trans-trans (tt)

Figure 81. Thermogrammes de DSC et déplacements des pics liés aux conformations gg (1), tg (2), gt (3) et tt (4) des nanofibres de PLA1 (a), PLA2 (b) et PLLA (c) en fonction de la température.

Figure 82. Chambre de flux et porte échantillon

Figure 83. %NH₂ (a), NH₂/N (b) et NH₂/C (c) des échantillons traités par plasma après 15 s, 30 s et 45 s

Figure 84. O/C en fonction du temps pour le film de PET et les structures textiles tissée et tricotée

Figure 85. Evolution du pourcentage de la surface recouverte par des fibres en fonction de la vitesse et du nombre de passage

Figure 86. Arrachement des nanofibres à partir des films de PET. Les échantillons font 25 mm de côté.

Figure 87. Prothèse tissée recouverte de nanofibres après 1 h dans la chambre de flux

Liste des abréviations

Abbréviation	Nom complet
¹ H-NMR	Résonnance magnétique nucléaire du proton
ADP	Adénosine diphosphate
AFM	Microscopie à force atomique
Ang	Angiopoïétine
ANOVA	Analyse de la variance
APDBD	Plasma à pression atmosphérique à décharge à barrière diélectrique
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	Réflectance totale atténuée
ATRP	Polymérisation radicalaire par transfert d'atome
BCP	Copolymères par blocs
BMC	Cellule de moelle osseuse
CDCl ₃	Chloroforme
CEC	Cellule endothéliale circulante
CL	Caprolactone
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DD	dimère DD (dextrogyre)
DL	dimère DL (dextrogyre-lévogyre)
DLA	D-lactide
DLLA	DL-lactide
DMF	Diméthyleformamide
DP	Degré de polymérisation
DSC	Calorimétrie différentielle à balayage
DTT	DL-dithiothréitol
EC	Cellule endothéliale
EDHF	Endothelium-derived hyperpolarizing factor
EPC	Cellule endothéliale progénitrice
ePTFE	Polytétrafluoroéthylène expansé
Fbg	Fibrinogène
FDA	Food and Drugs Administration
FGF	Fibroblast growth factor
Flk1	Fetal liver kinase 1
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GPC	Chromatographie par exclusion stérique
HMS	Espèce de haut poids moléculaire
HO-ss-Br	Double-head initiator labeled with a disulfide

HSVEC	Human saphenous vein endothelial cells
KHPM	Kininogène de haut poids moléculaire
LA	Acide lactique
LL	Dimère LL (lévogyre-lévogyre)
LLA	acide (L-lactique)
M199	Médium 199
MFb	Monomère de fibrine
MMP	Métaloprotéase
Mn	Masse moléculaire en nombre
Mw	Masse moléculaire en poids
NMR	Résonnance magnétique nucléaire
OEOMA	Oligo-éthylène oxyde méthacrylate
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Phosphate buffer solution
PCL	Poly(ϵ -caprolactone)
PDLA	Poly(D-lactide) ou acide poly(D-lactique)
PDLLA	Poly(DL-lactide) ou acide poly(DL-lactique)
PEG	Polyéthylène glycol
PEO	Polyéthylène oxyde
PEOH	poly(ethylene oxide monomethyl ether)
PET	Polyéthylène téréphtalate
PGI₂	Prostacycline
pH	Potentiel hydrogène
PLA	Polylactide ou acide polylactique
PLA-SS-Br	Acide polylactique-disulfure-Brome
PLCL	Poly(lactide-co- ϵ -caprolactone)
PLLA	Poly(L-lactide) ou acide poly(L-lactique)
PMDETA	<i>N,N,N',N''</i> -pentamethyldiethylenetriamine
POEOMA	Poly(Oligo-éthylène oxyde)-méthacrylate
POEOMA-g-PLA	Poly(Oligo-éthylène oxyde)-méthacrylate gréffé à l'acide polylactique
POEOMA-ss-PLA	Poly(Oligo-éthylène oxyde)-méthacrylate-disulfure-acide polylactique
PP	Polypropylène
PS (chapitre III)	Sérum physiologique
PS (Chapitre V)	Polystyrène
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
PU	Polyuréthane
RGD	Acide Arginine-Glycine-Aspartic

Rhodamine-Phalloïdine	Phalloïdine–Tétraméthylrhodamine B isothiocyanate
ROP	Ring opening polymerization
SEM	Microscopie électronique à balayage
SI-ATRP	Polymérisation radicalaire par transfert d'atome initiée par la surface
Sn(Oct)₂	Octoate de zinc
SRD	Stimuli-responsive degradation
T_g	Température de transition vitreuse
TGA	Analyse thermogravimétrique
THF	Tétrahydrofurane
T_m	Température de fusion
TM-DSC	Calorimétrie différentielle à balayage modulée en température
TMS	tétraméthylsilane
TOPEM	Calorimétrie différentielle à balayage en modulation stochastique
TPMA	Tris(2-pyridylmethyl)amine
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vWF	Von Willebrand factor
X_c	Taux de cristallinité
XPS	Spectroscopie photoélectronique X
XRD	Diffraction des rayons X

À Armand et à Liam...

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à Gaétan Laroche, mon directeur de thèse, tout d'abord pour m'avoir suivi quand j'étais à Mulhouse, puis de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Merci de m'avoir accordé ta confiance et de m'avoir donné une liberté totale sur le choix de mes recherches. Merci de ta disponibilité et d'avoir pris, à chaque fois, un peu de temps pour m'écouter, me conseiller et me soutenir. Je pense que sans un directeur de thèse aussi humble, sage, humain et tellement bon scientifique, je n'aurais pas fait un travail dont je suis si satisfait et je n'aurais pas autant grandi scientifiquement et personnellement. Merci pour ta bonne humeur toujours positive. Merci d'avoir accepté tous mes choix et de les avoir défendus. Merci de m'avoir envoyé à l'autre bout du monde pour défendre mes travaux. Peu d'étudiants ont cette chance. Merci d'avoir gravi la muraille de Chine avec moi au sens propre et au sens figuré. Tu es un exemple. J'ai beaucoup appris.

C'est avec beaucoup de plaisir que je remercie Bernard Durand, mon directeur de thèse, sans qui cette thèse n'aurait jamais vu le jour. Une thèse, en plus en cotutelle, n'est pas seulement une expérience d'étude ou professionnelle, c'est une expérience de vie. Merci de m'avoir choisi pour faire cette thèse et donner cette chance. Tu m'as fait confiance du début à la fin. Tu as su me transmettre cette passion scientifique si peu commune et cette conviction que tout est possible.

Je tiens à remercier également Florence Dieval, ma codirectrice de thèse et coauteure de toutes les publications de cette thèse. Merci pour ta gentillesse et pour toutes ces discussions et conseils au début de ma thèse et ton soutien de mon périple québécois.

J'exprime toute ma gratitude au Prof. Jean Ruel qui a accepté de juger mon travail à mon examen doctoral, en tant que pré-lecteur de cette thèse et membre du jury.

Je remercie très chaleureusement les membres du jury, Prof. Martin King et Prof. Sophie Lerouge qui ont accepté de juger ce travail.

Je remercie très chaleureusement Diego Mantovani, qui m'a suivi depuis mon arrivée à Québec. Merci de m'avoir accueilli pendant quatre années dans l'équipe de choc des

assistants d'enseignement du cours de matériaux pour l'ingénieur. Merci pour tous ces conseils et de m'avoir fait confiance pour tous les travaux que tu m'as confiés. C'est une chance et un grand honneur d'avoir travaillé avec toi.

C'est avec respect que je remercie le Prof. John Oh de l'Université Concordia. Merci d'être venu me chercher pour travailler avec toi et ton équipe. C'était une expérience unique dans laquelle j'ai pu apprendre une science qui m'était au départ inconnue. Merci à Nare Ko et Alexander Cunningham du *Oh Research Group* qui ont fait un travail incroyable sur notre publication. Je suis particulièrement fier d'avoir fait émerger cette collaboration entre le Prof. Oh et le Prof. Laroche.

Je remercie également le Prof. J.R Sarrasua de l'Université du Pays Basque (EHU). Quel privilège de travailler avec un groupe de recherche qui a fortement inspiré mes travaux ! Mes remerciements vont également à Jorge Fernandez de l'EHU. Je suis très heureux et également fier d'avoir pris part à ce travail collaboratif plein de promesse.

Je tiens à remercier ma collègue, amie et Professeure Corinne Hoesli de l'Université McGill qui m'a formée à la culture cellulaire. Merci Corinne, j'ai tellement appris !

Je remercie le Prof. Nabil Chakfé du CHU de Strasbourg pour notre collaboration et nos fructueuses discussions.

Je tiens à remercier très chaleureusement Stéphane Turgeon et Pascale Chevallier. Merci pour votre aide, votre patience, tous vos conseils personnels et professionnels et toutes ces discussions. Un merci très spécial à Andrée-Anne Guay-Bégin pour m'avoir beaucoup aidé cette dernière année. Ces quatre années au lab ont changé ma vie et vous y êtes pour beaucoup !

Un très très grand merci à Jacques Lacroix et Marie France Côté pour leur aide en culture cellulaire et leur disponibilité !

Je remercie Didier Le Nouen de l'ENSMu à Mulhouse qui m'a accueilli dans son lab et qui a trouvé la patience de répondre à mes questions sur la RMN.

Je tiens à remercier les professionnels de recherche du département de chimie, du Centre de Recherche sur les Matériaux Avancés et du département de Génie des Mines, de la Métallurgie et des Matériaux et de l'Université Laval. Merci à Rodica Plesu, Jean-François Rioux, Yann Giroux du CERMA et André Ferland du département de génie des Mines des Matériaux et de la Métallurgie pour leur accueil, leur disponibilité et leur aide très précieuse. Merci également à Arnaud de Coninck du Laboratoire Eau, Terre, Environnement de l'INRS à Québec.

Merci au Prof. Michel Nardin et à Simon Gree qui m'ont ouvert leurs portes au CNRS IS2M à Mulhouse.

Un immense grand merci aux stagiaires qui ont collaboré à ce projet de thèse. Merci à Pierre Abadie, Mohamed Gassoumi, Edouard Chauvet, Jean-François Mélançon et Moetaz Helmy.

Merci à Roland Bernard.

Je remercie la Région Alsace et le Centre Québécois des Matériaux Fonctionnels (CQMF) qui ont financé cette thèse.

Merci à l'équipe de choc des auxiliaires d'enseignement du cours de Matériaux pour l'ingénieur pour tous ces rires et période de stress lors des TD et des corrections ! J'en garderai un souvenir impérissable.

Je remercie la Dream Team du Chapitre de livre. Vous avez fait un travail incommensurable, extraordinaire, génial, ahurissant et carrément incroyable. Je sais que vous y avez mis votre cœur et je ne vous remercierai jamais assez. Un très grand merci à Lucie Levesque, qui a fait un très bon job !

Merci au premier et au deuxième bureau du CBS-QCSC, nous avons la chance d'avoir commencé quelque chose d'extraordinaire qu'il faudra perdurer à travers les années à venir.

Merci à mes collègues et amis du LPMT. Tout d'abord, merci à mes co-piaules de l'atelier de filage, Riaz Mir, Pauline Weisser, Mohamed Kechiche et Abdel Salem Malek, pour toutes ces discussions de thésard pendant mon début de thèse à Mulhouse. Un très grand merci à Frédéric Heim, Daniel Mathieu et Jean-Christophe Lejeune. Je remercie également Agnès Shwob et Aurélia Robert pour leur travail.

Je remercie Ginette Cadieux, Andrée Lord et Matine Demers du Département de génie des Mines, des Matériaux et de la Métallurgie qui ont fait un super travail.

Merci à mes collègues et amis du LIS. Merci à Ivan Rodriguez Duran, Morgane Laurent, Monsieur Julien Vallade, Caroline Royer, Ibrahim Bilem, Michael Byad, Saleheh Razavi, Mathieu Létourneau, Maryam Mavadat et Marie-Claude Boivin. Vous êtes tous incroyables, merci pour tous les moments qu'on a passé au lab et en dehors du lab !

Je remercie très particulièrement Aitor Larrañaga, mi pollo hermano !

Un très gros merci à mes amis Marie Leroy et Sébastien Meghezi pour leur énorme générosité et tous les moments passés ensemble !

Un merci très spécial à Olexander Bondarenko. Merci pour toutes ces randonnées et toutes ces discussions. Спасибі моїм другом.

Merci à tous mes collègues et amis que j'ai connus à l'UBB et à l'Université Laval. Sans ordre particulier. Merci à Essowe Mouzou, Nina Bono, Carlo Paternoster, Olivier Lesage, Vanessa Montaña, Giridhar Raghunathan, Daniele Pezzoli, Élisca Cauli, Afghany Mostavan, Éléonore Michel, Michel Bocourt, Dawit Gezahegn, Myriam Laprise-Pelletier, Christian Sarra-Bournet, Rodrigo Balonni, Syafiqah Saidin, Ranna Tolouei, Mariana Agostini de Moraes, Ludivine Hugoni, Mathieu Maisani, Maxime Cloutier, Meryem Bouchoucha, Marie-Cécile Klak, Giovana Genevros, Camillus Obayi, Juliana Valencia, Agung Purnama, Mathieu Bouchard, Jacopo Profili, Farid Anooshehpour, Jifu Mao, Margherita Botta, Livia Angeloni, Mahrokh Dorri, Erica Rosella, Betul Celebi, Juliana Vaz, Diane Djoumessi, Maxime Cloutier, Caroline Loy, Fanny Silencieux, Sergio Diaz, Malgorzata Sikora et

Clayton Souza Campelo. Merci à tous les gens du département du Génie des Mines, des Matériaux et de la Métallurgie. J'ai des souvenirs extraordinaires avec chacun d'entre vous. C'est grâce à vous que l'ambiance du lab est si unique et si agréable! Merci pour toutes ces belles années pleines de découvertes et d'émotions!

Je remercie la Bibliothèque Gabrielle Roy qui m'a accueilli, sans le savoir, pour écrire cette thèse. Je remercie le Murphy's et le Sham Rock de Mulhouse, la Barberie et la Ninkazi de Québec.

Un très grand merci à mes amis de Québec. Merci à Rémi, Benjamin, Julie, Laëticia, Eren, François, Geoffroy et Alexandra.

Un très grand merci à mes amis de Mulhouse. Merci à Lucas, Edith, Marie, Romain, Thomas, Freddy, Ronan, Raphaël et Valérie.

Un très grand merci à tous mes amis de Paris et d'ailleurs. Merci à Olivier, Pierre, Thomas, Lorlein, Stephen, Arnaud, Virgile, Antoine, Alexandre, Bastien, Nico Geiger, Amandine, Maxence, Florian, Maude, Michael, Julie, Nicolas et Gigi.

Merci à Colette et Didier. Merci pour votre soutien et votre aide. Vous m'avez accueilli chez vous et dans votre famille. Vous nous avez aidés à chaque moment et vous avez accepté, malgré vous, que l'on parte à l'autre bout du monde pour accomplir un rêve.

Merci à ma mami, pour l'amour qu'elle me porte. Merci à ma sœur Rosanna et à toute ma famille. Un merci spécial à Éric, mon oncle, qui a bien voulu lire et corriger ma thèse. Tu as toujours été un exemple pour moi.

Merci à Joëlle, ma maman. Merci de m'avoir poussé toute ma vie et soutenu jusqu'ici. Je sais que tu aimes bien les citations et j'en ai une pour toi : « On ne dit jamais assez aux gens qu'on aime qu'on les aime ». Je ne te le dirais jamais assez.

Merci à Alain, mon papa. Quand je te regarde, je sais qu'on est fait du même bois. Merci de m'avoir appris que lorsqu'on a un rêve, il faut aller jusqu'au bout. Merci de m'avoir fait

découvrir tellement de chose passionnante. Merci de m'avoir poussé. Merci de m'avoir appris à pédaler tout seul.

Merci à Armand Khalifa, mon grand-père, à qui je dédie cette thèse.

Un immense merci à Laurence, ma compagne, mon amour et ma meilleure amie. C'est un bonheur infini de t'avoir à mes côtés depuis toutes ces années. Je te remercie tellement pour ton soutien et pour tous les compromis que tu as faits. Merci d'être là dans les moments de douleur et merci de me faire tellement rire chaque jour. Je ne peux pas imaginer la vie sans toi.

Merci à Liam, mon petit bonhomme qui a changé ma vie, à qui je dédie cette thèse.

XXX

Avant-propos

Les maladies vasculaires représentent la plus grande cause de décès prématurés à l'échelle mondiale. Parmi les solutions proposées pour soigner ces maladies, le remplacement des vaisseaux sanguins par des prothèses synthétiques est, dans certains cas, la plus efficace. Le remplacement des artères élastiques de grands diamètres présente un très bon taux de réussite après implantation. Cependant, plus le diamètre diminue, plus la prothèse montre des risques de récurrence. De ce fait, le défi actuel de la chirurgie vasculaire réside dans la conception de prothèses artérielles viables de petits diamètres. Le besoin d'une telle solution, n'existant actuellement pas sur le marché, ne cesse donc de grandir. Depuis quelques années, les nouvelles stratégies de conception de dispositifs médicaux s'orientent vers la médecine régénérative. Ce domaine pluridisciplinaire vise à reconstruire des tissus vivants fonctionnels, *in situ* ou *in vitro*, afin de remplacer des organes ou des fonctions d'organes endommagés comme les vaisseaux sanguins.

Les travaux présentés dans cette thèse s'inscrivent donc dans une recherche mondiale et dynamique visant à développer de nouvelles stratégies pour améliorer les prothèses vasculaires. Ce projet s'inscrit à la frontière entre l'ingénierie, la science fondamentale et la médecine et propose des concepts innovants qui permettront, je l'espère, de contribuer à l'avancement de la science dans plusieurs domaines. Le but de cette thèse est de développer un échafaudage de nanofibres dégradables pour la régénération néo-intimale sur les prothèses vasculaires afin d'en améliorer l'hémocompatibilité. Nous avons, par ailleurs, concentré nos recherches sur le caractère dégradable du biomatériau. Même si ces travaux sont très ancrés en science des matériaux, notamment dans la conception, l'optimisation et la caractérisation de nouveaux matériaux à base de polymères dégradables, je suis convaincu que les systèmes développés constituent un fort potentiel d'application en médecine comme dispositifs implantables. De plus, cette thèse se veut ouverte et exploratoire ; tout en ne perdant pas les objectifs de vue, nous avons développé de nouveaux outils pour mieux aborder cette recherche.

Dans ce cadre pluridisciplinaire, cette thèse, en cotutelle, est conjointement présentée à l'École doctorale Jean-Henri Lambert de l'Université de Haute Alsace (UHA) à Mulhouse dans le cadre d'un doctorat en Mécanique et à la faculté des Sciences et Génie de l'Université Laval à Québec dans le cadre d'un doctorat en génie des matériaux et de la métallurgie.

Premier laboratoire d'accueil, le Laboratoire de Physique et Mécanique Textile (LPMT), relié à l'École Nationale Supérieure des Ingénieurs Sud Alsace sur le campus de l'UHA, possède une grande expérience et une très large expertise dans l'ingénierie textile et le textile technique pour tout type d'applications allant de la confection à l'aéronautique. Ancré dans une collaboration avec le Groupe Européen de Recherche sur les Prothèse Appliquée à la Chirurgie Vasculaire (GEPROVAS), l'équipe biomécanique du LPMT s'intéresse particulièrement à des problématiques de matériovigilance pour les substituts vasculaires, notamment les prothèses vasculaires textiles en polyéthylène téréphtalate (PET). Ces recherches ont donc pour but de caractériser des explants de ces dispositifs médicaux et proposer des améliorations après implantation à long terme.

Deuxième laboratoire d'accueil, le Laboratoire d'Ingénierie de Surface (LIS), rattaché au département de génie des Mines, de la Métallurgie et des Matériaux et, au Centre de Recherche des Matériaux Avancés (CERMA) et au Centre de Recherche du CHU de Québec (CRCHU de Québec), possède une grande expertise dans les stratégies de modification et caractérisation de surface pour des applications biomédicales mais surtout vasculaire. Les intérêts du LIS vont de la caractérisation de procédés de fonctionnalisation de surface à l'étude de l'interaction des matériaux et des cellules en passant par le greffage de molécules d'intérêt biomédical.

Dans ce contexte et dans la continuité d'une précédente thèse [1], les intérêts des deux laboratoires sont bien clairs. D'une part, il était nécessaire de proposer une solution, par rétro-ingénierie, qui permettrait d'améliorer les prothèses vasculaires textiles existantes en préservant leurs propriétés mécaniques, d'autre part, il était essentiel de concevoir une

interface dans le but de promouvoir la prolifération en monocouche des cellules endothéliales sur des surfaces textiles.

Après une introduction qui contextualise le sujet de thèse, le travail expérimental et d'analyse, effectué pendant ce doctorat, est présenté sous la forme de trois chapitres correspondant à trois articles publiés.

Le premier article (Chapitre III) intitulé « *Air spun poly(lactic acid) nanofiber scaffold degradation for vascular tissue engineering: a ^1H -NMR study* » est paru en 2012 dans la revue *Polymer Degradation en Stability*. Il traite de la caractérisation de la dégradation de PLAs commerciaux par résonance magnétique du proton. Dans ce travail, j'ai réalisé tous les concepts, conçu tous les protocoles et produit tous les échantillons. J'ai analysé et interprété toutes les données issues des méthodes de caractérisation. J'ai écrit la première version de l'article, conçu toutes les figures et mené toutes les discussions avec mes co-auteurs. Dr Didier Le Nouen a effectué toutes les mesures en résonance magnétique nucléaire (RMN) et participé à la discussion. Dr Pascale Chevallier a aidé par ses conseils et son suivi au travail d'écriture, à la correction et la mise en forme de l'article. Prof. Gaétan Laroche, par sa supervision, sa relecture et ses corrections, a contribué à une amélioration conséquente de l'article. Prs. Bernard Durand et Florence Dieval ont contribué par leur supervision, conseils, aide et corrections.

Le deuxième article (Chapitre IV) intitulé « *Evaluation of an air spinning process to produce tailored biosynthetic nanofibre scaffolds* » est paru en 2014 dans la revue *Material Science and Engineering C*. Il traite de l'optimisation de la technique de filage par jet d'air pour la production de nouveaux polymères et une meilleure compréhension de la formation des fibres. J'ai réalisé tous les concepts, conçu tous les protocoles, produit une partie des échantillons et effectué une partie des mesures. J'ai analysé une partie des données issues des méthodes de caractérisation et décrit toute l'interprétation des résultats. J'ai écrit la première version de l'article, produit toutes les figures et mené toutes les discussions avec mes coauteurs. M. Pierre Abadie a produit par filage par jet d'air une grande partie des échantillons puis analysé ces données par microscopie électronique à balayage (SEM) et

viscosimétrie. Prs. Bernard Durand et Florence Dieval ont contribué par leur supervision, conseils, aide et corrections. Gaétan Laroche, par sa supervision, son statut d'auteur de correspondance, par sa relecture et ses corrections, a contribué à une amélioration conséquente de l'article et au questionnement avec l'éditeur du journal.

Le troisième article (Chapitre V) intitulé « *Design, degradation mechanism and long-term cytotoxicity of poly (L-lactide) and poly (lactide-co- ϵ -caprolactone) terpolymer film and air-spun nanofiber scaffold* » a été publiée en 2015 dans la revue *Macromolecular Bioscience*. Il traite de la conception et de la caractérisation de nouvelles nanofibres à dégradation contrôlée pour des applications dans le domaine des biomatériaux vasculaires. J'ai réalisé tous les concepts, conçu la plupart des protocoles et produit tous les échantillons fibreux. J'ai effectué la dégradation des échantillons destinés aux essais biologiques et de SEM. J'ai effectué les essais préliminaires d'angle de contact, de profilométrie, tous les essais biologiques, les mesures de pH et les visualisations par SEM. J'ai analysé la plupart des données issues des méthodes de caractérisation, réalisé tous les calculs et décrit toute l'interprétation des résultats. J'ai écrit la première version de l'article, produit toutes les figures et mené toutes les discussions avec mes coauteurs. Dr Aitor Larrañaga a produit tous les films de polymère et dégradé tous les échantillons destinés à la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et chromatographie par exclusion stérique (GPC). Il a participé grandement à la discussion et l'analyse des résultats de DSC et GPC. Mme Andrée-Anne Guay-Bégin a contribué à la validation des procédures de culture cellulaire, par le suivi, la correction et son conseil dans la production de l'article. Dr Jorge Fernandez a effectué la synthèse des polymères et leur caractérisation par NMR. Prs. Bernard Durand, Florence Dieval et J.R. Sarrasua ont contribué par leur supervision, conseil, aide et corrections. Prof. Gaétan Laroche, par sa supervision, son statut d'auteur de correspondance, sa relecture et ses corrections, a contribué à une amélioration conséquente de l'article et au questionnement avec l'éditeur du journal.

Après une discussion, la présentation d'éventuelles perspectives et la conclusion, on peut retrouver un article d'annexe (Annexe I) écrit dans le cadre d'un projet parallèle à cette thèse en collaboration avec l'équipe du Prof. Jung Kwon Oh dont je partage la place de XXXIV

premier auteur avec le Dre Na Re Ko. Ces travaux parlent de la fonctionnalisation de nanofibres d'acide polylactique (PLA) par le greffage de molécule hydrophile sur la surface, rendu possible par la technique de polymérisation radicalaire par transfert d'atome initiée par la surface. Les annexes II à IV sont des travaux non publiés qui discutent de techniques de caractérisation avancées et de nouveaux protocoles afin de mieux comprendre la cristallinité des nanofibres. Ces travaux ont pour but de poser les bases à des recherches fondamentales sur la caractérisation de la dégradation de nanofibres de PLA et de poly(lactide-co- ϵ -caprolactone). Pour finir, l'annexe V présente des résultats préliminaires de travaux en collaboration avec le Prof. Jean Ruel et le Dr Catherine Tremblay du département de génie Mécanique de l'Université Laval et M. Mohamed Gassoumi, stagiaire au LIS et Étudiant à l'ENSISA à Mulhouse. Le but de l'étude est d'améliorer l'adhésion des nanofibres aux structures textiles des prothèses vasculaires par modification de surface.

La collaboration avec plusieurs étudiants et groupes de recherche m'a permis de prendre part à plusieurs projets. Tout d'abord, j'ai co-écrit et supervisé l'écriture d'un chapitre de livre, dont je suis le premier auteur. Ce travail a été effectué avec les équipes des professeurs Gaétan Laroche et Diego Mantovani du département de génie des Mines, de la Métallurgie et des Matériaux. Ce chapitre a pour titre « *Advanced materials for biomedical applications* » et figure dans le livre *Functionnal Materials* édité chez De Gruyter [2]. Ensuite, j'ai participé aux activités de recherche du Dr Aitor Larrañaga sur le greffage d'albumine sur la surface de films de PLCL. Ma participation réside dans la conception du PLCL, dans une partie des mesures en Calorimétrie différentielle à Balayage (DSC) et Chromatographie par exclusion stérique (GPC). Ce travail a donné lieu à une publication dans laquelle j'ai en partie travaillé à la correction et au questionnement. Cet article, dont je suis le quatrième auteur, a été publié dans la revue *Biomatter* sous le titre « *Grafting of a model protein on lactide and caprolactone based biodegradable films for biomedical applications* » [3]. J'ai collaboré également avec Mme. Morgane Laurent, étudiante au LIS, pour son projet de doctorat qui porte sur le développement d'une matrice dégradable polymériser par plasma et utilisée en tant que système de relargage de médicament. J'ai

participé aux études de cytotoxicité des recouvrements polymérisés par plasma. Ce travail a déjà été présenté dans deux conférences, à la conférence annuelle de la Société Canadienne des Biomateriaux et à la 14th *International Conference on Plasma Surface Engineering* en 2014, et sera publié prochainement. Enfin, j'ai apporté mon expertise dans le domaine des nanofibres dans le projet de maîtrise M. Giridhar Raghunathan, étudiant au Laboratoire d'Organogénèse Expérimental sous la direction du professeur Prof. François Auger de l'Université Laval et du Prof. Larry Unsworth de l'Université d'Alberta. Son projet porte sur la conception d'échafaudage à base de nanofibres dégradables et tubulaires pour la mise en forme de vaisseaux sanguins par ingénierie tissulaire et se présente comme une suite possible à mon projet.

Je pense que le travail de chercheur ne s'arrête pas à ses activités de laboratoire et à ses publications mais doit contribuer à la diffusion du savoir, à la vie de sa communauté et de son université, même en tant qu'étudiant au doctorat. Dans ce but, j'ai pu participer à l'organisation de la conférence Thermec 2011 à Québec et du colloque étudiant du CERMA en 2012. De plus, j'ai siégé durant l'année 2013 au comité de programme de 2^{ème} et 3^{ème} cycle du département de génie des Mines, de la Métallurgie et des Matériaux de l'Université Laval. Finalement, afin de créer un pôle Québécois fort au niveau national et international dans le domaine des biomateriaux, j'ai cofondé avec Monsieur Sébastien Meghezi et Madame Marie Leroy, tous deux étudiants au doctorat, le chapitre étudiant de Québec de la Société Canadienne des Biomateriaux.

Je crois que la transmission du savoir et l'enseignement fait partie du travail du chercheur académique. Je me suis donc investi dans des activités d'enseignement et de supervision de stagiaires. Au cours de mes années de thèse, en tant qu'enseignant et auxiliaire d'enseignement, j'ai pu donner les cours, travaux dirigés et pratiques de résistance des matériaux et conception mécanique assistée par ordinateur à l'ENSISA et les cours de thermodynamique métallurgique et de matériau pour l'ingénieur du département de génie des Mines, des Matériaux et de la Métallurgie de l'Université Laval. Également, mon travail ne serait pas ce qu'il est sans la participation très active d'étudiant stagiaire : M. Moetaz Helmy de l'Université Française d'Egypte, M. Pierre Abadie co-auteur du

XXXVI

troisième chapitre de cette thèse, M. Jean-François Melançon, de l'Université Laval, M. Edouard Chauvet, étudiant en échange avec l'Université Laval et M. Mohamed Gassoumi de l'ENSISA à Mulhouse.

Chapitre I. Introduction

Ce travail de thèse a pour objectif de concevoir et de fabriquer des échafaudages de nanofibres biocompatibles et dégradables afin de favoriser l'endothélialisation des prothèses vasculaires ; l'endothélialisation étant le recouvrement des prothèses vasculaires par des cellules endothéliales, cellules tapissant naturellement la paroi des artères.

Ce travail s'insère dans un projet plus vaste d'une recherche mondiale dont le but est la création d'une solution viable à long terme pour le remplacement de vaisseaux sanguins de petits diamètres, qui connaissent les plus haut taux d'échec après implantation.

Le but de cette introduction est de mettre en contexte le sujet de thèse en résumant, tout d'abord, le fonctionnement du système vasculaire puis plus précisément la physiologie et la mécanique artérielle. Ensuite, une courte revue de la littérature décrira le rôle de l'endothélium puis, les maladies vasculaires. Les solutions pour enrayer ces maladies vasculaires seront évoquées ainsi que leurs résultats cliniques. Enfin, un état de l'art des stratégies les plus communes et les plus utiles pour la compréhension de la thèse sera présenté.

1. Le système cardiovasculaire

1.1 Le sang

Le sang est le seul tissu « liquide » du corps humain. Présent chez tous les mammifères, les oiseaux et certains invertébrés, ce fluide vivant et complexe est composé de corpuscules en suspension dans du plasma. Il contribue à de nombreuses fonctions telles que le transport de nombreuses molécules (oxygène, dioxyde de carbone, substance nutritives, métabolites, électrolytes), la transmission des signaux hormonaux entre les organes, la défense immunitaire ou la stabilité du milieu intérieur en termes de pH (7,4 en moyenne), de température (37°C) et de volume (3,5L à 5L dépendant de la masse corporelle) [4].

Les cellules sanguines sont de trois types : les hématies ou érythrocytes appelées communément globules rouges, les globules blancs (leucocytes) et les plaquettes (thrombocytes) (Figure 1).

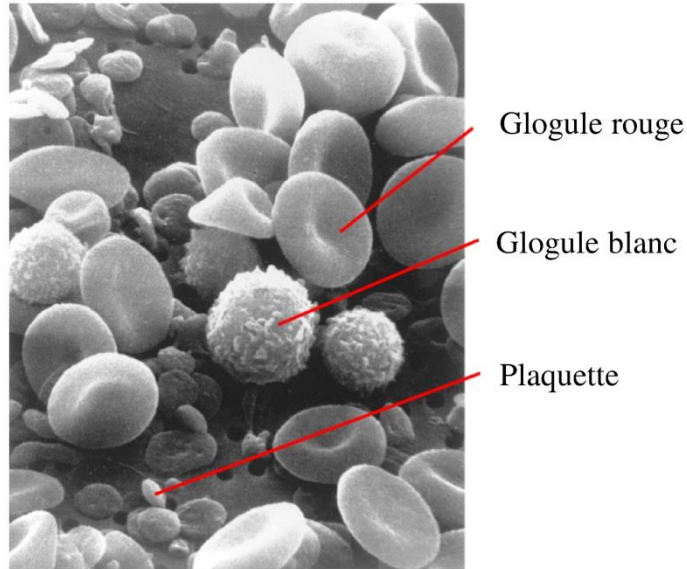


Figure 1. Cellules sanguines au microscope électronique à balayage [5]

Les érythrocytes, issus de la lignée rouge, sont biconcaves (Figure 1) et mesurent $7,5\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre environ. Leur forme et leur flexibilité leur octroie la possibilité de circuler dans des vaisseaux de très petits diamètres. Leur nombre est très important contrairement aux autres cellules (500 000/ml de sang). Elles ont pour fonction principale le transport d'oxygène et du dioxyde du carbone et participe à la régulation du pH.

Les globules blancs sont issus des lignées granulocytaire et lymphocytaire. On dénombre 5000 à 10000 cellules/ml de sang. La fonction globale des globules blancs est la défense immunitaire mais ils sont regroupés en trois familles selon leur nature et leurs fonctions spécifiques : les lymphocytes B et T, les monocytes et les polynucléaires, principalement neutrophiles. Les polynucléaires neutrophiles sont spécialisés dans la lutte antibactérienne. Les monocytes ont pour fonction la phagocytose tandis que les lymphocytes reconnaissent et attaquent les micro-organismes nocifs.

Les thrombocytes ou plaquettes (Figure 1) sont produites lors de l'éclatement du cytoplasme des mégacaryocytes. Leur concentration dans le sang se situe entre 150000 et 400000 cellules/ml de sang et leur durée de vie est de 8 à 10 jours. Leur taille est beaucoup plus petite que les autres cellules sanguines (2 à 3,5 μm). Ces cellules procaryotes possèdent, en plus des organelles cellulaires communes, des granules contenant des protéines (sérotonine et adénosine), du calcium et des facteurs intervenant dans la croissance des cellules musculaires lisses et dans l'hémostase. La compréhension du fonctionnement de ces cellules est très importante car elles participent fortement dans le processus de thrombose.

Le plasma est une solution aqueuse composée d'électrolytes, de protéines et de matière organique. La composition du plasma est très précise et joue un rôle prépondérant sur la stabilité de l'organisme. Les électrolytes vont intervenir dans le contrôle du pH, par le couple acide carbone-ion bicarbonate, et dans la répartition de l'eau. Les protéines, selon leur nature, jouent un rôle dans la pression osmotique du plasma, dans la défense immunitaire et dans le transport de substance métallique ou hormonale. Les constituants organiques sont quant à eux importants dans la vie cellulaire [6].

1.2 Le cœur

Le cœur est un viscère creux situé entre les deux poumons. Ce muscle est la « pompe » du système cardiovasculaire. Il permet de propulser le sang à travers tout le corps par l'appareil circulatoire. Cet organe contractile se régule par influx nerveux selon le besoin du corps en oxygène.

Le cœur est divisé en quatre parties appelées ventricules (droit et gauche) et oreillettes (droite et gauche). La diastole et la systole sont provoquées par contraction du myocarde, paroi entourant le cœur et séparant les quatre parties entre elles. Le sang pauvre en oxygène provenant de la veine cave s'accumule dans l'oreillette droite, passe par le ventricule droit pour être diffusé dans les artérioles des poumons en circulant par l'artère pulmonaire. Le sang enrichi en oxygène arrive à l'oreillette gauche par les veines pulmonaires, puis, est

rejeté vers l'aorte en passant par le ventricule gauche. L'aorte est l'artère possédant le plus grand diamètre. Elle permet de distribuer le sang aux organes par l'intermédiaire des différentes artères.

Le cœur s'autoalimente en sang par les artères et les veines coronaires. Les artères coronaires proviennent d'une bifurcation de l'aorte à la sortie du cœur tandis que les veines coronaires qui se connectent directement à l'entrée du cœur par la veine cave.

1.3 Le système circulatoire

Le système circulatoire (Figure 2.a) est composé du cœur, des artères, des artérioles, des capillaires puis des veinules et des veines. Les artères (Figure 2.b) sont les conduits d'approvisionnement en sang des organes. Leurs diamètres diminuent puis, elles se divisent pour devenir des artérioles. A l'intérieur des organes, les artérioles deviennent des capillaires. Les capillaires sont le lieu d'échange des gaz et des nutriments véhiculés par le sang. Les capillaires sont également le passage du système artériel au système veineux ce qui fait de la circulation sanguine un système clos. Le système circulatoire est divisé en deux systèmes distincts : la circulation pulmonaire et la circulation systémique. La circulation pulmonaire est un système d'alimentation en oxygène et la circulation systémique, un système de distribution en oxygène. Le cœur fonctionne en série et ne possède qu'une entrée et une sortie. A l'inverse, le système circulatoire fonctionne en parallèle et les organes sont alimentés en même temps [7].

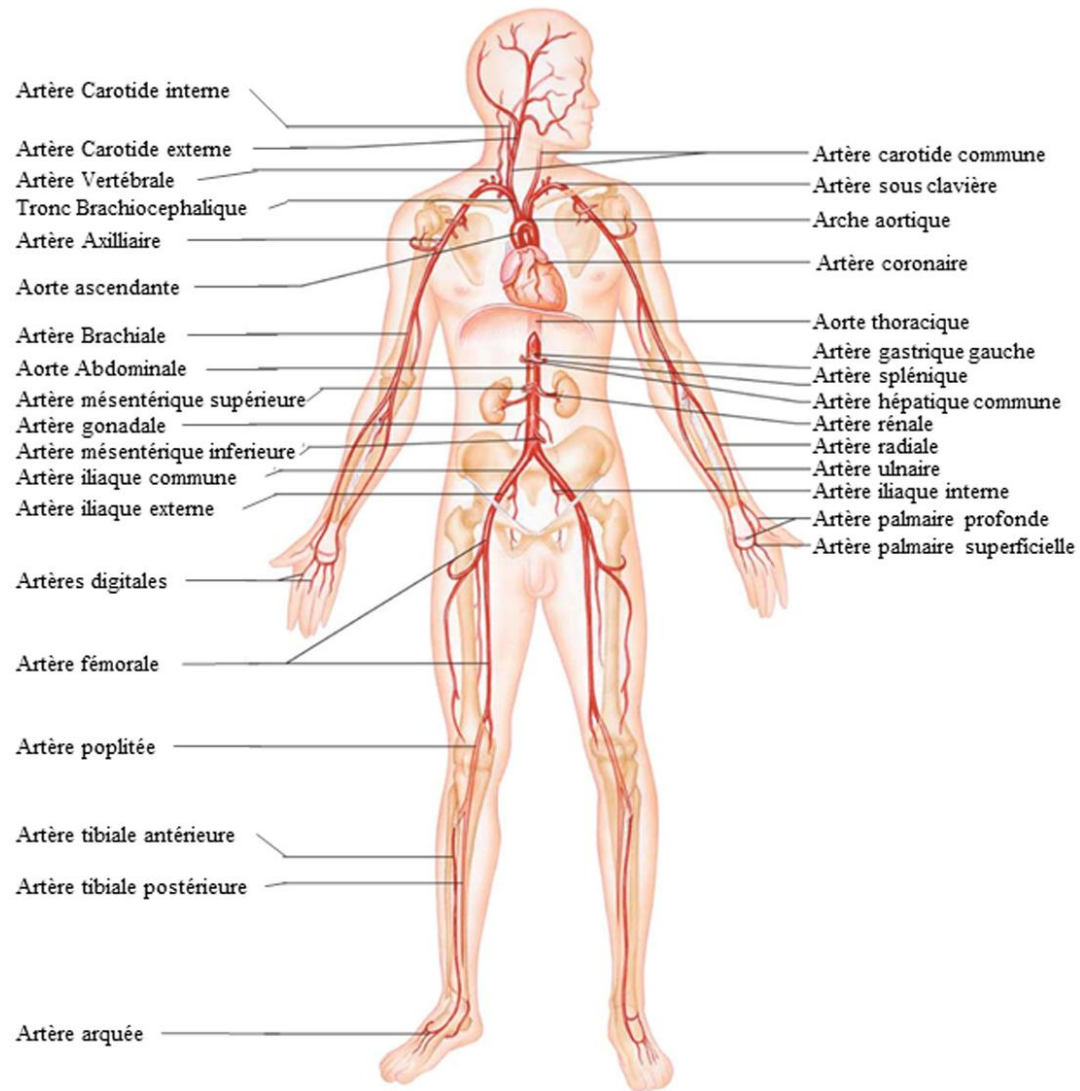


Figure 2. Le système artériel (adaptée de [8])

2. Les vaisseaux sanguins

Dans cette section, les vaisseaux sanguins, et particulièrement les artères, seront décrits de plusieurs points de vue ; tout d'abord physiologique puis structurel et mécanique.

2.1 Physiologie des vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins (Figure 3) se composent de plusieurs couches successives qui ont chacune une composition et des fonctions très différentes.

L'adventice est la tunique externe et la « gaine » de l'artère. Elle est composée de nerfs, d'une matrice de fibres de collagène et d'élastine où se trouvent des fibroblastes. Les fibres de l'adventice sont orientées longitudinalement, ce qui lui confère la fonction de résister à la pression du flux hémodynamique [9]. Il possède également, pour les artères de grands diamètres, des petits vaisseaux (*vasa-vasorum*) qui alimentent la média [10].

La média, couche moyenne de l'artère, se compose essentiellement de plusieurs lamelles coaxiales de cellules musculaires lisses [11]. L'interstice entre les cellules est comblé par des fibres d'élastine et du collagène orientées perpendiculairement au flux sanguin [12]. La média dirige les phénomènes de vasoconstriction et vasodilatation. Cependant, elle n'est qu'un élément passif en termes de gestion, car ce sont en partie les messages délivrés par les cellules endothéliales qui contrôlent ces phénomènes mécaniques.

L'endothélium, couche interne de l'artère, repose sur une membrane basale composée essentiellement de collagène et de laminine qui a notamment pour fonction l'adhésion et l'organisation des cellules endothéliales [13].

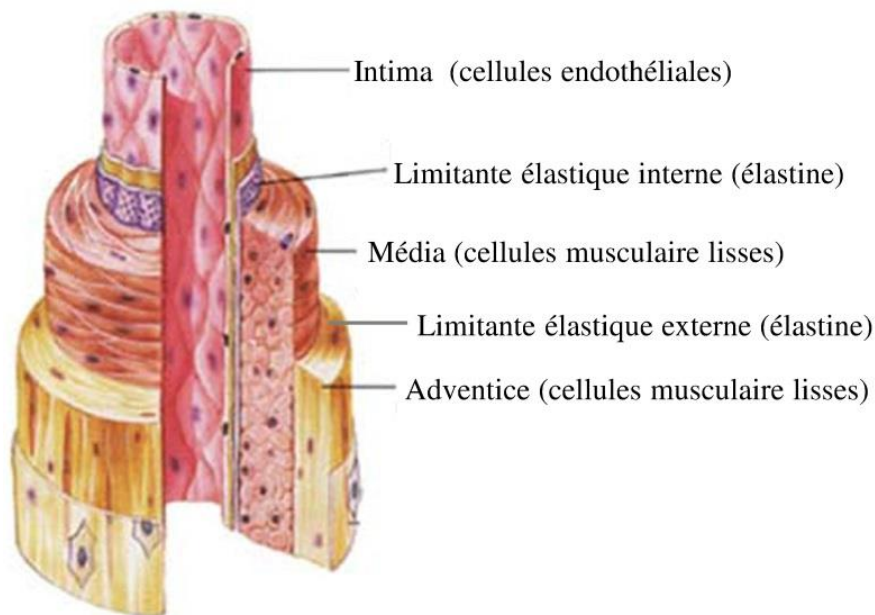


Figure 3. Différentes couches d'une artère (adaptée de [14])

2.2 Mécanique des vaisseaux sanguins

Comme énoncé précédemment, les vaisseaux sanguins sont des matériaux composites multicouches complexes. En effet, les cellules des artères vont produire essentiellement du collagène et de l'élastine organisés différemment suivant les couches de l'artère mais aussi suivant la localisation des vaisseaux sanguins dans le corps ce qui amène à plusieurs phénotypes cellulaires. Ces spécificités sont principalement dues aux contraintes hémodynamiques appliquées sur la paroi des artères.

2.2.1 Hémodynamique

Le sang est propulsé en sortie du cœur par l'aorte. L'écoulement du sang dans les vaisseaux peut être décrit par l'écoulement d'un fluide laminaire dans une conduite droite et cylindrique. On peut donc considérer un petit élément cylindrique de cette conduite défini par son rayon r et sa longueur δx . En appliquant le principe fondamental de la dynamique sur cet élément suivant l'axe de la conduite (x) et en considérant que le fluide est pleinement développé (accélération nul et pression dans le sens de la vitesse), on obtient une relation qui relie la force de cisaillement (τ) à la pression (p), mais aussi à la vitesse du fluide (Équation 1).

$$\tau = \eta \frac{du}{dr} = \frac{r}{2} \frac{dp}{dx} \quad (\text{Eq. 1})$$

avec U la vitesse qui dépend de r , du rayon de la conduite (R), de la viscosité du fluide (η) et du gradient de pression à travers l'élément ($\frac{dp}{dx}$).

En intégrant la vitesse en fonction de r entre $r = 0$ et $r = R$, on obtient l'Équation 2.

$$u = \frac{1}{4\eta} \frac{dp}{dx} (R^2 - r^2) \quad (\text{Eq. 2})$$

La vitesse moyenne du fluide ($\bar{U}$) à travers la conduite est égale à moitié de la vitesse maximum ($u_{\max}$) défini au centre de la conduite ($r = 0$). On peut donc relier le débit moyen

(Q), défini par la vitesse passant au travers d'une section du tube (A), et la pression qui peut être intégrée sur une longueur fixe L (Équation 3).

$$Q = \bar{U} \times A = \frac{1}{2} u_{\max} \times \pi R^2 = \frac{\pi R^4}{8\eta L} \Delta P = \frac{\Delta P}{R_s} \quad (\text{Eq.3})$$

où R est le rayon de la conduite en mètre, L la longueur en mètre, ΔP la différence de pression entre l'entrée et la sortie de la conduite en Pa, Q le débit moyen en m³/s, η la viscosité du sang en Pa.s et R_s la résistance à l'écoulement.

D'une part, l'Équation 1 montre que le taux de cisaillement évolue de manière linéaire par rapport au diamètre des vaisseaux sanguins et dépend donc de la localisation des vaisseaux pour une longueur donnée. De plus, les vaisseaux sanguins ne sont pas des conduits droits et se divisent en formant des zones de bifurcation où les forces de cisaillement sont particulièrement élevées. On note des valeurs de 15 dyn/cm² à 20 dyn/cm² dans les zones droites et des valeurs excédant 100 dyn/cm² dans les bifurcations [15,16].

D'autre part, l'Équation 3 donne une relation entre le débit cardiaque et la pression artérielle. On observe que le débit est d'autant plus grand que le diamètre est petit, ce qui augmente donc la résistance à l'écoulement. Les valeurs de pression artérielle varient de 80 mmHg à 140 mmHg en phase de systole et de 60 mmHg à 90 mmHg en phase de diastole. Les contraintes engendrées par cette pression dépendent de l'épaisseur de la paroi et sont de l'ordre de quelques dizaines de kPa.

2.2.2 Collagène et élastine

Le collagène [17] est la protéine la plus abondante du corps humain et a pour fonction principale d'apporter la résistance mécanique des tissus. Elle est synthétisée dans la cellule sous forme de solution de procollagène puis sécrétée dans le milieu extracellulaire. On dénote environ une trentaine de type de collagène déterminé suivant leurs structures. Quatre types sont présents dans les vaisseaux sanguins [18]:

- Les collagènes de type I et III sont tous les deux présents dans l'adventice tandis que les cellules musculaires lisses ne sont composées que du type I. Ces types de collagène sont sous formes fibrillaires et jouent un rôle direct dans le comportement mécanique des tissus.
- Le collagène de type IV compose la lame basale des cellules endothéliales. Les intégrines, récepteur d'adhésion cellulaire de ces cellules, sont directement liées à ce support.
- Le collagène de type VIII est présent dans l'endothélium et grandement impliqué dans la croissance des vaisseaux sanguins.

L'élastine est également une molécule fibrillaire qui possède une très grande élasticité. Elle a pour but de contrebalancer les faibles propriétés d'élasticité du collagène.

Un mélange de collagène et d'élastine permet donc d'apporter des propriétés mécaniques précises aux artères entre résistance mécanique et élasticité. On retrouve également ce mélange collagène-élastine dans la plupart des organes.

2.2.3 Relations structure/propriété des vaisseaux sanguins

La Figure 4a montre la composition relative de collagène et d'élastine dans les artères élastiques, les artères musculaires, les artérioles et les capillaires. On observe que les artères élastiques contiennent plus d'élastine que de collagène tandis que les artères musculaires contiennent plus de collagène. De plus, des essais de traction longitudinale et transversale sur des artères musculaires et élastiques montrent également que l'organisation de l'élastine et du collagène dans les artères n'est pas la même suivant la position de l'artère dans le corps. Par exemple, la déformation à la rupture des artères élastiques, comme l'aorte abdominale, est plus grande suivant l'axe transversal (Figure 4b). Au contraire, la déformation à la rupture des artères musculaires, comme l'artère brachiale, est plus grande suivant l'axe longitudinal (Figure 4c).

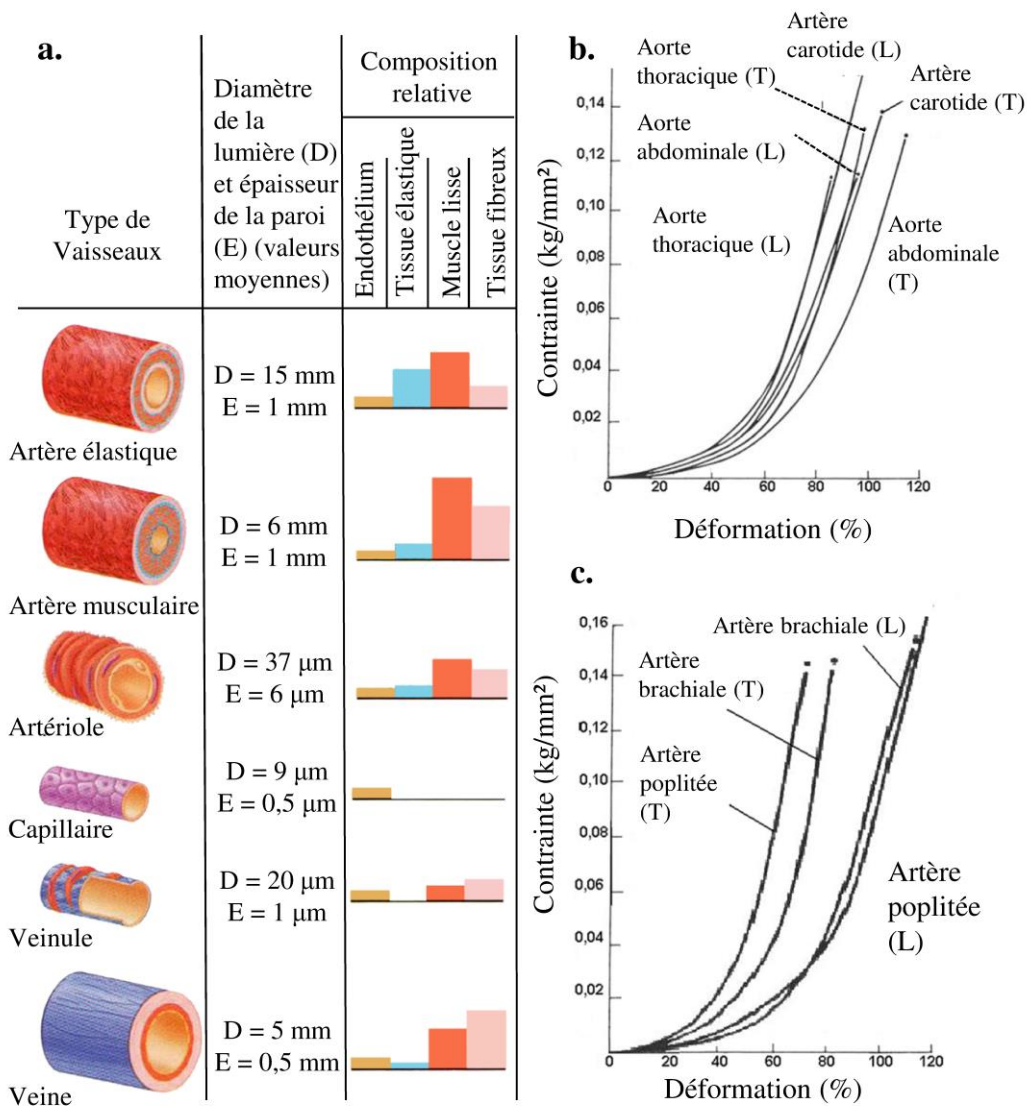


Figure 4. a. Composition et caractéristiques structurales des vaisseaux sanguins (adaptée de [8]) ; **b.** Courbes contrainte-déformation longitudinale et transversale d'artères élastiques (adaptée de [19]); **c.** Courbes contrainte-déformation longitudinale et transversale d'artères musculaires (adaptée de [19])

2.2.4 Relation structure/actions mécaniques des vaisseaux sanguins

Les Figures 4 et 5 mettent en relation la composition en élastine et en collagène avec la pression du sang sur les parois.

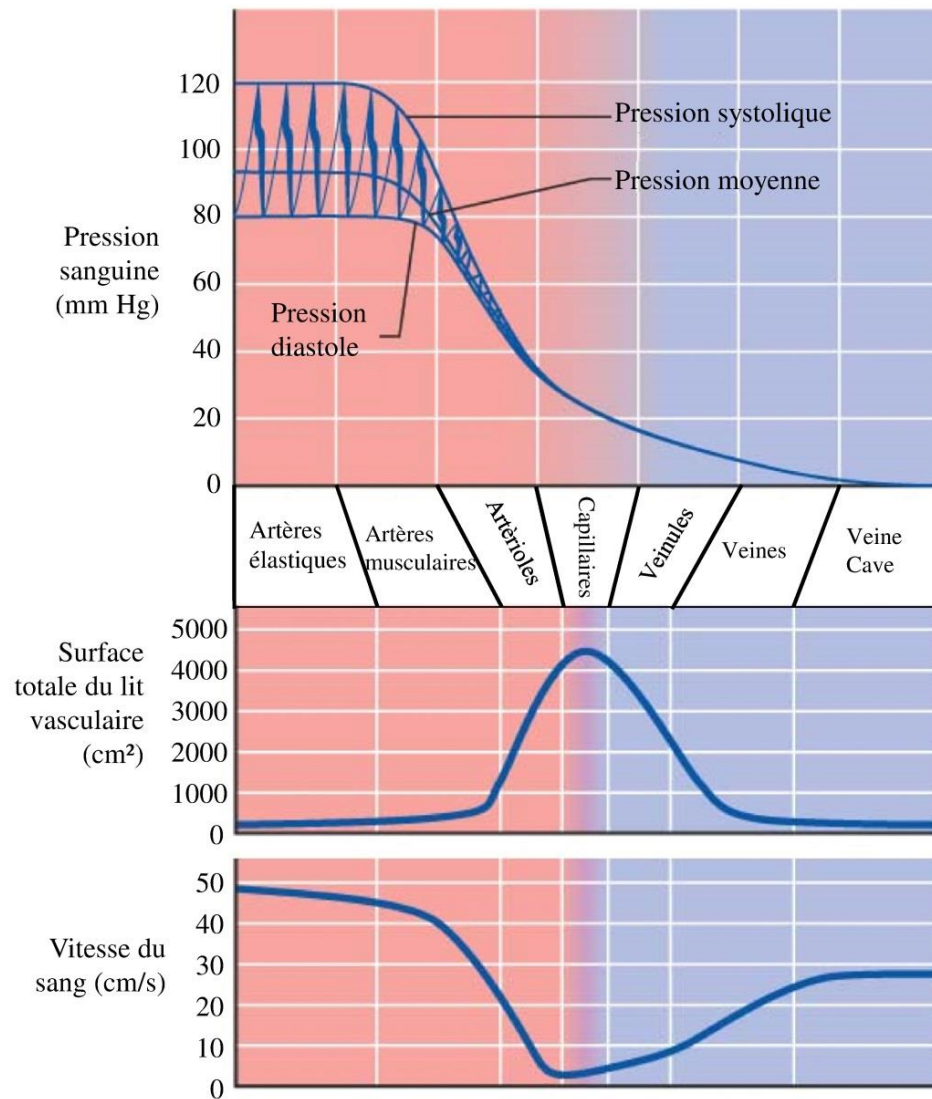


Figure 5. Pression sanguine, surface du lit vasculaire et vitesse de sang (adaptée de [8])

La première observation est que la pression a un caractère dynamique (pseudo-sinusoïdal) et pulsé. Cette pulsation s'atténue au fur et à mesure de la distance parcourue pour disparaître au niveau des capillaires. L'atténuation est en relation avec la quantité d'élastine dans les artères. De plus, la pression et la vitesse diminuent de manière drastique avec l'augmentation du pourcentage de collagène (fibres musculaires) dans les artères. Cette baisse est d'autant plus forte que le diamètre diminue. La relation de Poiseuille (Équation

3) justifie ce comportement le rayon apparaissant au degré 4. Au niveau des capillaires, l'écoulement du sang est laminaire, continu et de faible vitesse. La perméabilité de la paroi augmente ce qui permet le passage des nutriments et l'échange gazeux au niveau de l'organe.

2.2.5 Compréhension globale de la mécanique vasculaire

Les vaisseaux sanguins sont très actifs mécaniquement. Grâce à leurs compositions, le flux sanguin subira divers traitement en voyageant dans le système circulatoire [20].

- **Les artères élastiques** possèdent une grande élasticité transversale grâce à une grande concentration d'élastine dans la couche média. Lors de la contraction cardiaque (systole), les grosses artères se distendent et absorbent l'énergie potentielle fournie par le flux. A la fermeture de la valve aortique et du relâchement cardiaque (diastole), les artères reviennent à l'équilibre et restituent l'énergie emmagasinée. Cet effet, appelé effet Winkessel, transforme le flux pulsé en sortie du cœur en flux continu. On définit ces artères comme très compliantes ; la compliance artérielle étant la capacité de la paroi à se déformer élastiquement sous la pression sanguine.
- **Les artères musculaires** possèdent une importante concentration de collagène repartit en majorité suivant l'axe longitudinale, ce qui les qualifie d'artère résistive. Elles vont donc travailler en traction/compression radiales et faire diminuer la vitesse et la pression artérielle.
- **Les bifurcations** sont les zones de séparation des artères où localement la pression est très élevée et le flux sanguin turbulent.
- **Les artérioles**, tout comme les artères musculaires, participent à la résistance artérielle. Ces artérioles possèdent des sphincters qui ont pour but de contrôler le diamètre en entrée des capillaires. En effet, d'après la loi de Poiseuille (Équation 3), plus le diamètre est faible, plus la résistivité est grande et plus la vitesse du sang diminue.

- **Les capillaires**, ne possédant qu'un endothélium, ne sont pas mécaniquement actifs mais sont pourvus d'une très grande perméabilité. Ils sont le lieu d'échange de l'oxygène, du dioxyde de carbone et des nutriments entre le sang et les organes. La diminution drastique de la vitesse sanguine et de la composante pulsée du sang en amont permet donc d'optimiser ces échanges tout en empêchant la rupture des capillaires.
- **Les veinules et les veines** possèdent très peu d'élastine. Elles représentent un lieu de stagnation du sang due à leur grand volume global. Avec le cœur, les veines et les veinules constituent un réservoir de sang. Les grosses veines sont extrêmement résistantes et possèdent un très grand diamètre. Ces spécificités permettent un retour rapide au cœur. De plus, les veines possèdent des valves servant de clapet de non-retour afin d'éviter les reflux sanguins dus à la gravité.

Les fonctions des vaisseaux sanguins sont majoritairement expliquées par l'analyse de l'endothélium.

3. Endothélium

Les cellules endothéliales sont des cellules aplaties et chargées négativement. La face apicale est en contact avec la lumière du vaisseau et la face basale est liée à la membrane sous-endothéliale et aux cellules adjacentes par des desmosomes (Figure 6). La cellule endothéliale mesure, *in vivo*, 10-15 μm de largeur et 20-50 μm de longueur, et est orientée dans la direction du flux sanguin. Longtemps considéré comme une barrière inerte protégeant des fuites de sang, l'endothélium est, depuis plus de 50 ans, au centre de tous les intérêts dans de nombreux domaines de la médecine. En effet, les cellules endothéliales jouent un certain nombre de rôles fondamentaux dans le système vasculaire visant à son intégrité et son bon fonctionnement. D'origine médullaire, elles permettent de filtrer sélectivement et localement les éléments contenus dans le sang, assurent la mécanotransduction qui régit la vasoconstriction et la vasodilatation, elles sont responsables de l'angiogenèse et contrôlent la coagulation sanguine. Cette section a pour

but de détailler ces fonctions de l'endothélium et de développer son importance dans ce projet.

3.1 Origine embryonnaire et expression de marqueurs cellulaires

Les cellules endothéliales dérivent principalement des cellules mésenchymateuses de l'embryon et de leur différenciation en hémangioblastes dans le mésoderme. Ces cellules multipotentes donnent naissance aux lignées endothéliales, mais aussi hématopoïétiques. Ce processus embryonnaire de prolifération, migration et différenciation en précurseurs endothéliaux ou hématopoïétiques est appelé vasculogénèse. Les hémangioblastes vont s'agréger ; les cellules situées à l'intérieur des agrégats se différencient en précurseurs hématopoïétiques et celles à l'extérieur en précurseurs endothéliaux. Ce processus se poursuit par angiogénèse afin d'obtenir un endothélium fonctionnel. Les cellules prolifèrent, se spécialisent et sont stabilisées par des cellules dites murales. Finalement, des cellules musculaires lisses et fibroblastes sont différenciées de manière complexe à partir de différentes cellules mères pour former les vaisseaux sanguins [21].

Ces étapes s'effectuent grâce à de nombreux facteurs de croissances généraux à la lignées cellulaires mais aussi spécifiques aux étapes de différenciation. Ces facteurs se lient à des marqueurs génétiques présents sur le cytoplasme de la cellule. Par exemple, la descendance endothéliale issue de l'hémangioblaste est caractérisée notamment par des marqueurs génétiques communs comme Flk1 (VEGFR-2) [22], récepteurs du facteur *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Un autre facteur de croissance important lié à un grand nombre de cellules est la famille des *fibroblast growth factors* (FGF). L'angiogénèse est également décelée par la surexpression de l'angiopoïétine-1 (Ang1) et l'angiopoïétine-2 (Ang2) [21].

Ces marqueurs permettent également de caractériser le type cellulaire. La différenciation entre les cellules souches hématopoïétiques et les cellules endothéliales est, par exemple, déterminée par la présence du marqueur CD34 chez le précurseur, les cellules endothéliales artérielles et les cellules souches hématopoïétiques [23].

3.2 Interaction sang/endothélium

L'endothélium est une barrière semi-perméable qui permet de réguler les échanges entre le sang et les organes. Ces échanges peuvent s'effectuer par plusieurs mécanismes. Les gaz passent généralement par diffusion passive au travers de la cellule. L'eau ou les sels peuvent franchir l'endothélium par les canaux aqueux ($< 40\text{\AA}$). Les lipides et les protéines peuvent être assimilés dans le cytoplasme par pinocytose. Enfin, les plus grosses molécules sont généralement propagées de manière active par des récepteurs transmembranaires. C'est uniquement au niveau des reins que les grosses molécules passent la barrière endothéliale de manière passive car le phénotype cellulaire endothéliale possède des cavéoles, pores de grands diamètres.

Les cellules endothéliales régulent également la coagulation sanguine car elles sécrètent à la fois des protéines coagulantes et anticoagulantes mais aussi antiplaquettaires. C'est un équilibre entre coagulation et anticoagulation qui permet l'intégrité du vaisseau. En temps normal, les cellules endothéliales offrent une surface antithrombogénique (Figure 6a). En effet, les cellules endothéliales sont recouvertes sur leur face apicale d'une mince couche chargée négativement appelé glycocalyx endothélial [24]. Cette surface est composée de protéoglycanes et de glycoprotéines qui empêchent l'adhérence des plaquettes. Un autre mécanisme entre également en jeu. Les cellules endothéliales sécrètent constamment de la prostacycline (PGI_2) et du monoxyde d'azote (NO), molécules qui inhibent entre autre l'activation des plaquettes et des monocytes et permettent la relaxation des cellules musculaires lisses.

3.3 Autres influences des contraintes mécaniques sur les cellules endothéliales

Le flux sanguin et notamment ses propriétés hemodynamiques vont induire des effets sur les cellules endothéliales. Tout d'abord, des observations ont montré qu'à faibles débits et faibles pressions les cellules endothéliales sont polygonales. Cependant, lorsque le débit et la pression augmentent les cellules vont s'allonger et s'orienter suivant le sens du flux [25]. Ces signaux mécaniques engendrent donc différents phénotypes cellulaires ainsi que

l'expression et la production de différentes molécules (facteur tissulaire, ICAM, etc.). Ces observations conduisent à la conclusion que les cellules endothéliales possèdent des capteurs à la surface du cytosquelette de la cellule. Ces capteurs sont en fait des canaux ioniques produisant des messages sous formes d'ions à l'intérieur du cytoplasme. Les mécanismes réels du passage de la stimulation mécanique à la fabrication d'ions sont encore mal connus, cependant une hypothèse voudrait que le flux sanguin, par interaction physique avec la membrane plasmique, conduise à une polarisation physique de la cellule et à une ouverture des canaux ioniques. Finalement, ce mécanisme engendrerait un afflux d'ions calciums et la délivrance de message lié à la mécanotransduction.

3.4 Mécanotransduction

La vasodilatation et la vasoconstriction sont des phénomènes stimulés par les forces de cisaillement hémodynamiques et régies par la cellule endothéliale. En effet, le flux sanguin stimule la synthèse de monoxyde d'azote (NO). Le NO, en se diffusant à travers la lame basale, permet la synthèse de monophosphate de guanosine cyclique, molécule impliquée dans la vasodilatation. La prostacycline est un autre vasodilatateur. Son taux de production dépend de l'amplitude de la force de cisaillement et permet de la contrer avec les cellules musculaires lisses comme médiateur [26]. D'autres molécules sont impliquées dans la vasodilatation et sont connues sous le nom *d'endothelium-derived hyperpolarizing factor* (EDHF) ce qui engendre d'autres mécanismes permettant de réguler la polarisation, l'allongement et la relaxation de la membrane des cellules musculaires lisses. Ces mécanismes aboutissent également à des réactions qui ont pour effet la dépolarisation et la vasoconstriction [27,28]. Une fois de plus, ce sont les cellules endothéliales, stimulées par le flux sanguin, qui sont responsables de la vasoconstriction. Les forces de cisaillement du flux sanguin permettent la production d'endothéline-1 qui, en se fixant aux récepteurs spécifiques de la cellule musculaire, induit une réponse contractile. On peut noter que plus on s'éloigne du cœur plus le flux est laminaire et moins l'endothéline-1 est produite. Les cellules endothéliales ne communiquent pas seulement avec les cellules musculaires lisses mais aussi avec les cellules sanguines. Ces signaux sont responsables de l'hémostase.

3.5 Hémostase

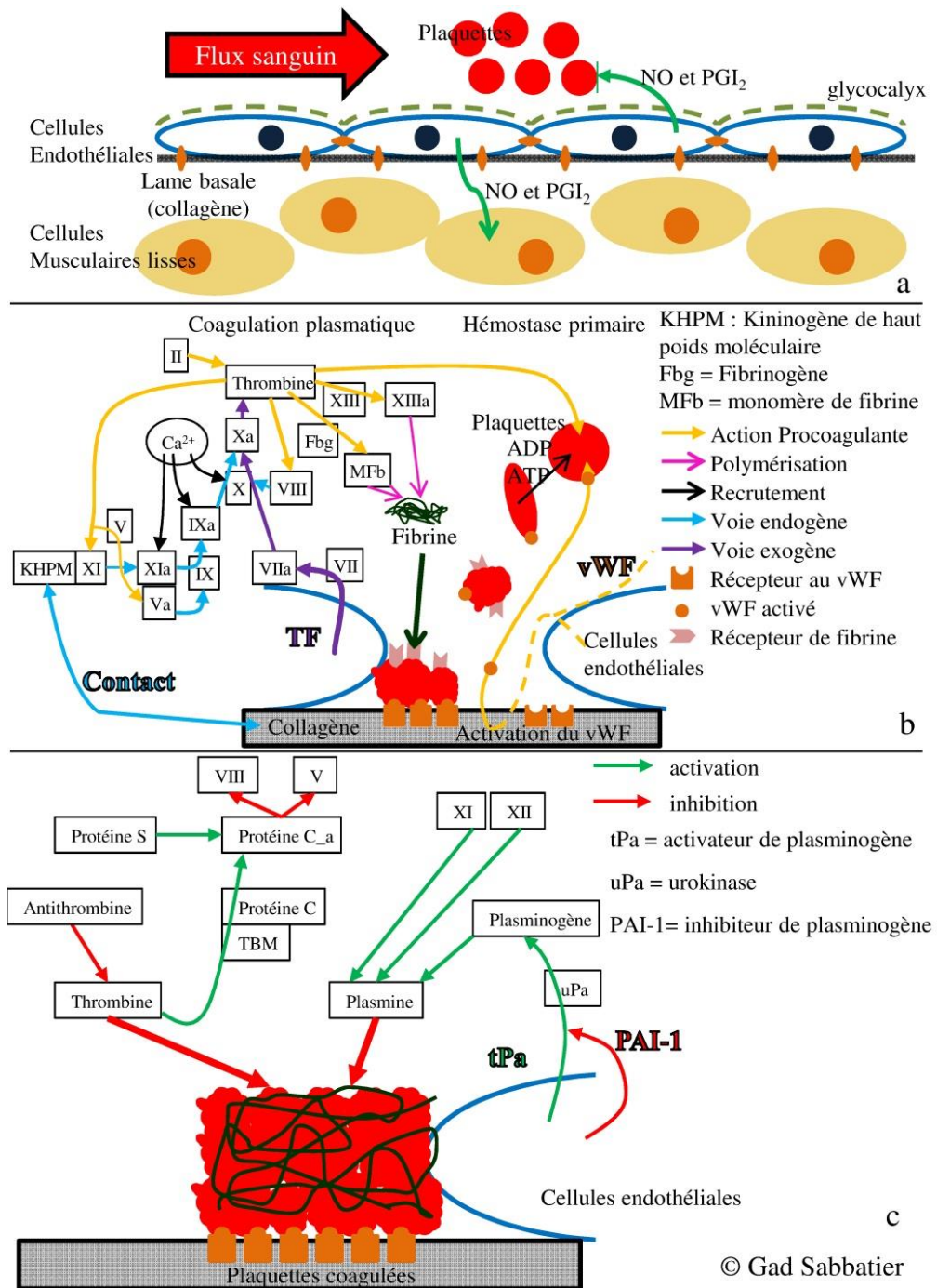


Figure 6. Hémostase. **a.** Fonctionnement normal. **b.** Hémostase primaire/coagulation plasmatique **c.** Inhibition de la coagulation/fibrinolyse

Lorsque l'intégrité du vaisseau est compromise par une lésion vasculaire, l'hémostase se déclenche. L'hémostase commence par une contraction réflexe du vaisseau ce qui ralentit la circulation sanguine. Ensuite, trois mécanismes entrent en jeu : l'hémostase primaire (Figure 6b), la coagulation plasmatique (Figure 6b) et la fibrinolyse [29–31] (Figure 6c). L'hémostase [31] primaire débute par l'activation du facteur de Von Willebrand (vWF) [29], sécrété par la cellule endothéliale aux abords de la lésion. Il permet de lier le collagène aux plaquettes. Cette activation entraîne une déformation des plaquettes qui libère des sécrétions (sérotonine, ATP, ADP...) recrutant d'autres plaquettes et font ressortir des récepteurs de fibrine. La fibrine joue le rôle de ligand entre les plaquettes et permet de consolider l'agrégat plaquettaire. Cependant, il est nécessaire de la polymériser car elle n'est pas initialement présente sous cette forme : c'est le but de la coagulation plasmatique. Cette réaction concomitante [30] à l'hémostase primaire est l'activation « en domino » des facteurs de coagulation (glycoprotéines plasmatiques synthétisées par le foie) par réaction de complexation qui va permettre la polymérisation de la fibrine. Deux voies aboutissent à cette synthèse, d'une part la voie exogène, par contact entre la membrane basale et le sang, et d'autre part la voie endogène, par contact entre une surface chargée négativement et le sang. La voie exogène débute par la complexation entre le facteur tissulaire, sécrété par la cellule endothéliale, et le facteur VII qui s'active. De son côté, la voie endogène aboutit par une cascade de réactions de complexation au facteur XI. Puis, la réaction des produits des deux voies avec des ions calcium donne un complexe enzymatique, la prothrombinase (facteur X). La prothrombine (facteur II) et la prothrombinase réagissent ensemble pour donner de la thrombine. Finalement, la thrombine permet de solubiliser le fibrinogène, réservoir de fibrine inactive, en monomère et d'activer le facteur XIII nécessaire à la polymérisation du caillot de fibrine (thrombus). L'importance de la thrombine est capitale, car elle permet l'amplification du phénomène en dopant les plaquettes et la demande en fibrinogène. La thrombine est stoppée dans son élan par l'antithrombine et les protéines S et C qui favorisent la fibrinolyse. La fibrinolyse est la dégradation de la fibrine par réaction avec la plasmine [32]. Dans certains cas particuliers, une autre fonction des cellules endothéliales est l'initiation de la formation de vaisseaux sanguins.

3.6 Angiogenèse post-natale

L'angiogenèse est la formation de nouveaux vaisseaux germant à partir de vaisseaux préexistants [33]. Chez un individu adulte et sain, on n'observe aucune angiogenèse. Les cellules endothéliales produisent autant d'activateur que d'inhibiteur d'angiogenèse. Les cas d'angiogenèse sont principalement repérés dans la revascularisation ovarienne, le développement vasculaire chez l'embryon, la cicatrisation et la vascularisation des tumeurs malignes. Le mécanisme est le même pour chaque situation mais les acteurs sont différents. La première étape est la dégradation de la lame basale grâce à un stimulus angiogénique qui permet la migration des cellules endothéliales, leur organisation et la formation d'un « germe de capillaire ». Cette étape est suivie de la prolifération des cellules endothéliales, de leur différenciation et de la reformation de la lame basale.

L'activateur principal de l'angiogenèse est le VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Le VEGF constitue en réalité une famille de protéines, chaque membre de cette famille se déclinant sous plusieurs formes selon le nombre d'acides aminés qui composent leur chaîne. Les VEGF-A sont responsables de l'angiogenèse tandis que les VEGF-B et VEGF-C permettent la formation des vaisseaux lymphatiques. Les récepteurs de VEGF sont situés sur les cellules endothéliales et sont sélectifs suivant la famille. Une fois ancrés dans la cellule, ils vont stimuler la synthèse de l'ADN et donc la prolifération cellulaire. Ils favorisent également la migration et l'adhésion [34].

On peut citer d'autres facteurs qui vont agir sur la croissance d'un vaisseau comme les angiopoïétines et les éphrines. Par exemple, l'angiopoïétine Ang1 va jouer le rôle d'agoniste à VEGF-A en stabilisant ses effets. Au contraire, Ang2, plus présent dans néo-vascularisation ovarienne, déstabilise l'angiogenèse, soit en dopant VEGF-A lors de sa présence soit en régressant la croissance vasculaire lors de son absence [35,36]. Les éphrines, contrairement aux angiopoïétines, ont un rôle à part ; elles permettent de guider la croissance cellulaire. L'étude des facteurs angiogéniques est une voie prometteuse soit dans le domaine vasculaire en les surexprimant, soit dans la lutte contre le cancer en les inhibant [37].

D'autres cellules jouent un rôle primordial dans l'angiogenèse comme les fibroblastes et les cellules progénitrices endothéliales.

3.7 Cellules circulantes, microparticules et progéniteurs endothéliaux

Les cellules endothéliales circulantes (CEC) ont été recensées dans les années 70 puis caractérisées dans les années 90 grâce au développement des anticorps monoclonaux spécifiques. Chez l'individu normal, les CECs sont rarement présentes (10 cellules/mL de sang). Elles sont caractéristiques d'un détachement de l'endothélium probablement dû à un cisaillement mécanique, une mauvaise adhérence aux autres cellules ou à l'hydrolyse des protéines de la matrice. Cependant, lors de pathologie ou de facteur à risque cardiovasculaire (hypertension...), de transplantation rénale, de maladies auto-immunes liées à l'endothélium ou de certains cancers, leur taux est anormalement élevé. L'intérêt de ces cellules pour les scientifiques est de s'en servir comme marqueur. En effet, il est possible de connaître leurs phénotypes, identifier leur zone d'origine et cibler une pathologie [38]. De plus, leur taux est un indicateur de la gravité de la maladie et de son avancement. Par exemple, les CECs ont été corrélées à la sévérité de la sclérodermie [39] ou à l'efficacité d'un traitement contre le cancer [40].

Les microparticules endothéliales (EMP) sont également des marqueurs de pathologie liées à l'endothélium. Décrites pour la première fois en 1999, elles s'expriment lors de l'activation et de la mort endothéliale et sont définies comme des vésicules de petite taille. Elles possèdent la plupart des fonctions des cellules endothéliales comme l'hémostase, le tonus vasculaire ou l'angiogenèse. Tout comme les cellules endothéliales, elles ont des activités antagonistes (pro-thrombotique/ anticoagulante, pro-inflammatoire/ anti-inflammatoire) et permettent ou non d'aggraver la pathologie. Aujourd'hui, ces corpuscules sont à l'état de recherche mais pourraient être utilisés comme marqueurs de l'efficacité de traitement contre les maladies cardiovasculaires [38,41].

Les progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) sont des cellules fabriquées dans la moelle osseuse qui ont la capacité de proliférer et de se différencier en cellules endothéliales

adhérentes et spécifiques. *In vivo*, les PECs ont donc montré qu'elles participaient à l'angiogénèse. Ce processus est encore mal connu, cependant il a été prouvé que leur recrutement sur les sites de liaison et leur adhérence dépendent en partie des taux de VEGF et d'ICAM-1 (molécule responsable à l'adhérence des cellules endothéliales). Les premières études cliniques sur ces cellules ont montré que les patients atteints de maladies vasculaires chroniques avaient un déficit de fonctionnement des EPCs. De plus, un taux anormalement bas d'EPCs a été détecté chez des patients présentant les facteurs de risque cardiovasculaires traditionnels. Le nombre et la capacité fonctionnelle des EPCs constitueraient donc des marqueurs potentiels de la prédisposition aux maladies cardiovasculaires [42]. De plus, une élévation transitoire entre la réponse des CECs et des EPCs chez des patients atteints d'ischémie suggèrent des compétences complémentaires ; l'une alerte, l'autre répare. Au contraire, une absence de retard de déclenchement ou un rapport CECs/EPCs trop faible montrerait une réponse inadaptée de l'endothélium [43]. Ces paramètres pourraient permettre d'établir un pronostic, par exemple, sur le succès d'une réparation vasculaire.

Les CECs, les EMPs, et les EPCs sont donc d'un grand intérêt pour les scientifiques non seulement dans le domaine de l'ingénierie tissulaire pour la néo-endothélialisation *in vivo* mais aussi en oncologie ou le diagnostic préopératoire ou postopératoire.

4. Pathologies Vasculaires

Les facteurs de risque liés à l'hygiène de vie (tels une mauvaise alimentation, le tabagisme, la sédentarité) font des maladies cardiovasculaires la principale cause de décès dans le monde. La Figure 7 montre, en effet, que les cardiopathies ischémiques et les accidents vasculaires cérébraux sont les deux premières causes de mortalité. Par exemple, en Amérique du Nord, 20 % de la population est touchée directement par les maladies cardiovasculaires [44]. De plus, les statistiques de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) présente que ces maladies sont de loin les pathologies qui diminuent le plus l'espérance de vie en dessous de 75 ans [45].

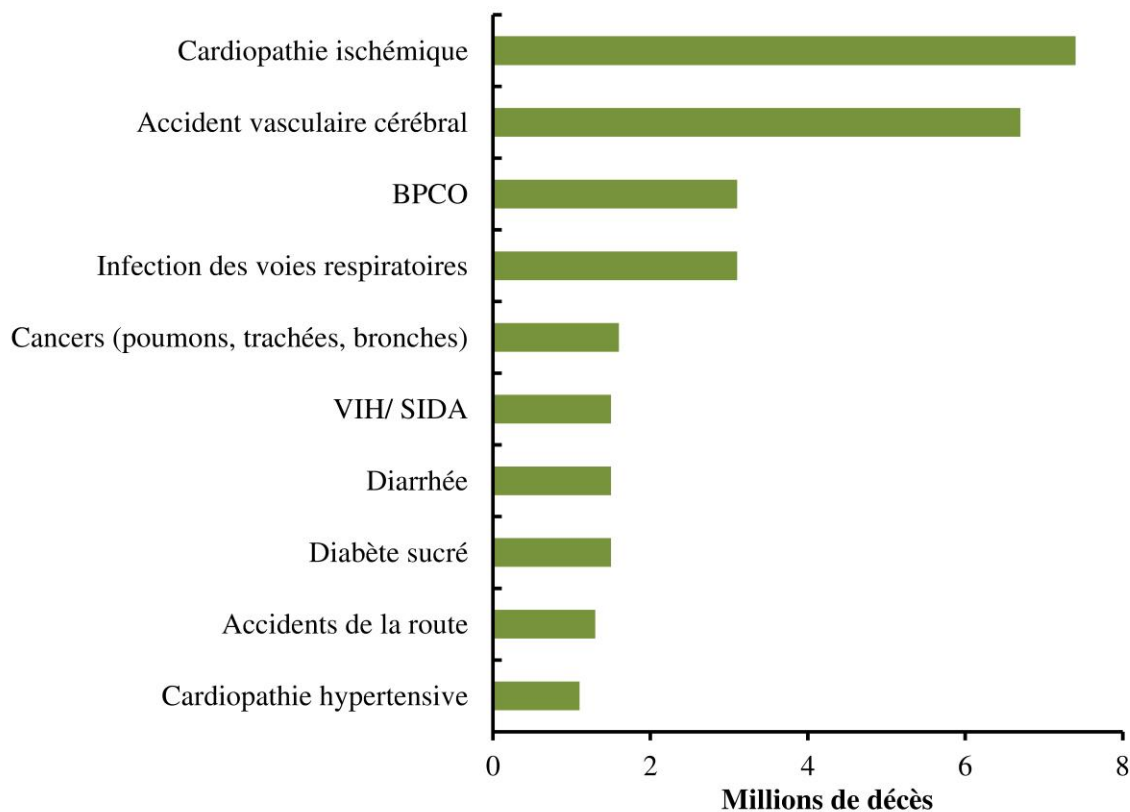


Figure 7. Les 10 premières causes de décès à l'échelle mondiale en 2012. (adaptée de [46]).

De manière générale, la plupart des cas de maladies vasculaires ont pour origine l'athérosclérose et peuvent se décrire par deux mécanismes, soit la voie de la sténose, soit la voie de l'anévrisme. Outre l'athérosclérose, les maladies vasculaires peuvent occasionner de l'hypertension ou des problèmes d'hémostase. Cette section a pour but de décrire les mécanismes qui mènent aux pathologies vasculaires et à l'intervention médicale.

4.1 Athérosclérose

Elle se définit comme « une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyens calibres consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôt calcaire ; le tout s'accompagnant de modifications de la média » (définition de l'OMS, 1958).

De manière générale, l'athérosclérose est un processus artériel de formation de plaques d'athérome qui se développe localement sur plusieurs décennies (Figure 8) et dont l'origine est encore mal comprise. Tout d'abord, des couches lipidiques se déposent sur la paroi artérielle, conduisant ainsi au recrutement des monocytes. Ceux-ci se différencient ensuite en macrophages spumeux (saturés en lipide) et intègrent la couche sous-endothéliale de l'artère. Ensuite, les cellules musculaires lisses de la *média* vont migrer et proliférer dans cet interstice pour former des centres lipidiques où le cholestérol cristallise et les macrophages sont inactifs. La population des centres lipidiques est essentiellement constituée de ces cellules musculaires lisses dont le comportement est profondément altéré par ces échanges biochimiques avec les macrophages. Les centres lipidiques vont être peu à peu entourés par un échafaudage de fibres lipidiques intégrées dans une matrice extracellulaire constituée principalement de collagène et de glycoprotéines. Une prolifération excessive des cellules musculaires lisses peut être ensuite créée par des stimuli inadaptés. La plaque d'athérome se nécrose, se calcifie et se fissure ensuite par processus de fatigue mécanique. Finalement, le processus de coagulation se met naturellement en action ce qui aboutit généralement à une thrombose [44] (Figure 8).

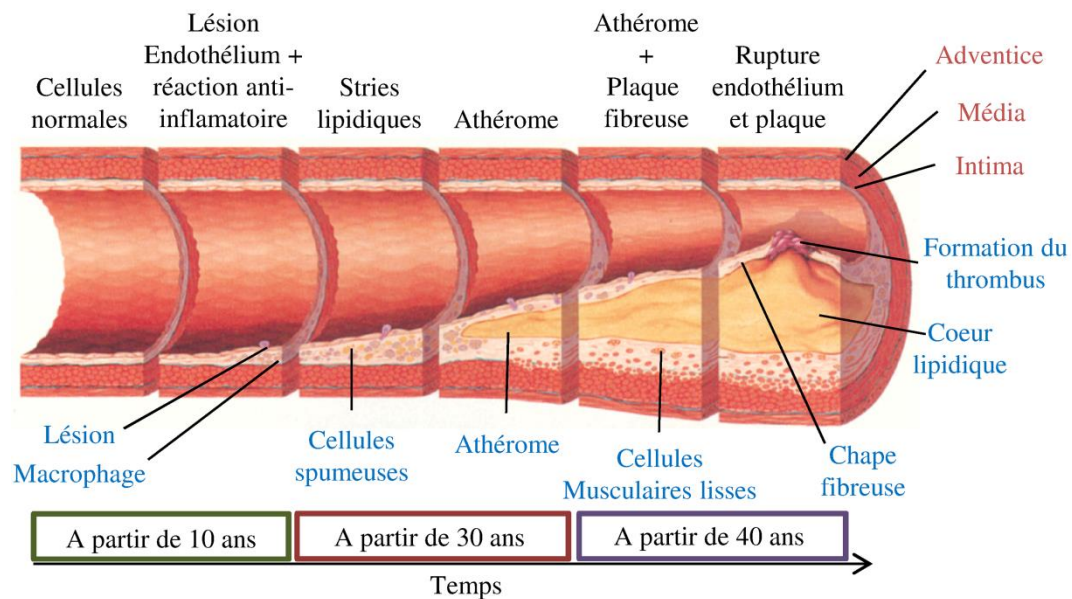


Figure 8. Évolution de l'athérosclérose (adaptée de [47])

Le comportement des cellules musculaires lisses peut également suivre une autre voie. En effet, certains facteurs peuvent inhiber la croissance des cellules musculaires lisses, entraînant ainsi leur apoptose. L'absence locale de cellules musculaires lisses conduit à la perte des propriétés mécaniques de l'artère et crée ainsi un gonflement appelé anévrisme.

Une voie de compréhension des mécanismes sous-jacents au processus d'athérosclérose se situe dans la particularité des zones affectées et de leurs géométries spécifiques. En effet, ces zones à risque sont concentrées au voisinage des bifurcations ou des courbures des vaisseaux sanguins. Ces observations ont permis de mettre en évidence qu'au niveau de ces zones à risque (Figure 9), les écoulements sont turbulents ce qui peut créer, d'une part, des zones de stagnation propices au dépôt de lipides ou au déclenchement de la coagulation et d'autre part, des contraintes locales très hétérogènes. Couplées à un stress physiologique, ces caractéristiques peuvent influencer très fortement sur le comportement des cellules musculaires lisses par le biais des cellules endothéliales [48].

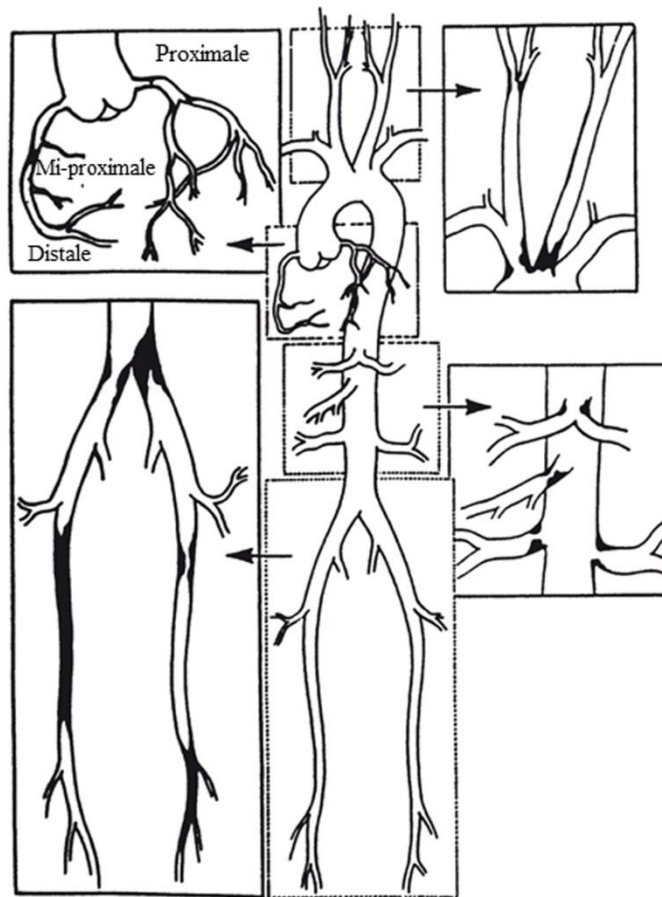


Figure 9. Distribution des plaques d'athérosclérose chez l'humain (adaptée de [48])

4.2 Thrombose

La thrombose est la création d'un caillot sanguin appelé thrombus qui a pour conséquence de boucher partiellement ou totalement un vaisseau sanguin. Le phénomène de thrombose peut être une conséquence directe du processus d'athérosclérose (Figure 8), mais aussi généré par de l'hypertension artérielle, d'une stagnation du flux sanguin, une perte d'intégrité vasculaire ou d'une maladie affectant les facteurs de coagulation.

Lors d'une lésion vasculaire, la présence de facteurs de coagulation implique la formation d'un clou plaquettaire (section 3.5). Le flux sanguin est donc perturbé localement et ceci peut entraîner l'accumulation des plaquettes aux abords du clou plaquettaire. Les plaquettes ainsi que la thrombine formée lors de la coagulation plasmatique produisent de l'ADP qui

permet l'amplification du phénomène en dopant les plaquettes et ainsi la demande en fibrinogène. Cette accumulation de plaquettes de fibrine, mais aussi de globules blancs et rouges forme un thrombus. La thrombose peut également être couplée avec d'autres facteurs tels que la participation d'acides gras ou un dérèglement de la fibrinolyse. Le caillot peut oblitérer complètement le vaisseau sanguin et provoquer l'ischémie ou l'embolie d'un organe. Il peut également migrer à travers le flux sanguin et se loger dans des vaisseaux plus petits.

4.3 Anévrisme

L'anévrisme (Figure 10) est la dilatation et la perte de propriétés mécaniques de l'artère et peut aboutir, si le problème n'est pas traité à temps, à une rupture et une hémorragie interne. L'anévrisme peut être une conséquence directe de l'athérosclérose, d'une perte des propriétés de la couche média due à une maladie congénitale ou de l'hypertension.

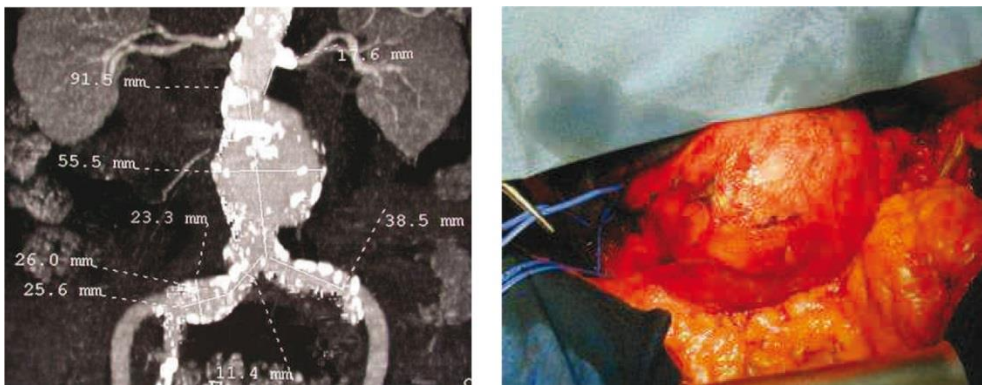


Figure 10. Anévrisme de l'aorte abdominale [49]

4.4 Artériosclérose et calcification

L'artériosclérose est un processus de calcification qui est due majoritairement à un vieillissement naturel des artères. La prolifération et le renouvellement général des cellules des organes diminuent naturellement avec l'âge ce qui entraîne une apoptose locale des cellules musculaires lisses. Le calcium libéré lors de la mort cellulaire couplé aux cytokines inflammatoires spécifiques produit par les macrophages permet la différenciation des

fibroblastes en cellules ostéogéniques produisant des minéraux comme l'hydroxyapatite. Ce phénomène engendre une augmentation de la dureté et de la fragilité des vaisseaux sanguins. De plus, la calcification des artères peut néanmoins être accélérée par de l'insuffisance rénale et participe également aux derniers stades de la formation de la plaque d'athérome. Du fait de l'apoptose des cellules musculaires lisses, du calcium est libéré et durcit la plaque d'athérome ce qui provoque sa rupture.

5. Substituts vasculaires

Hormis les procédures de prévention et d'éducation de la population faites par les autorités sanitaires à propos du tabagisme, de la sédentarité, de la nutrition ou de la régularité des visites médicales, la prise en charge des patients par le corps médical afin de traiter une maladie vasculaire s'effectue au cas par cas et selon la gravité de la maladie (Figure 11). Les choix des praticiens hospitaliers à propos des soins promulgués aux patients sont donc dépendants de plusieurs facteurs qui ne peuvent être déterminés qu'après des examens médicaux. La procédure expliquée dans cette section est simplifiée et ne tient pas compte des facteurs comme l'âge, la santé physique et les antécédents médicaux, mais plutôt de l'évolution de la plaque d'athérome.

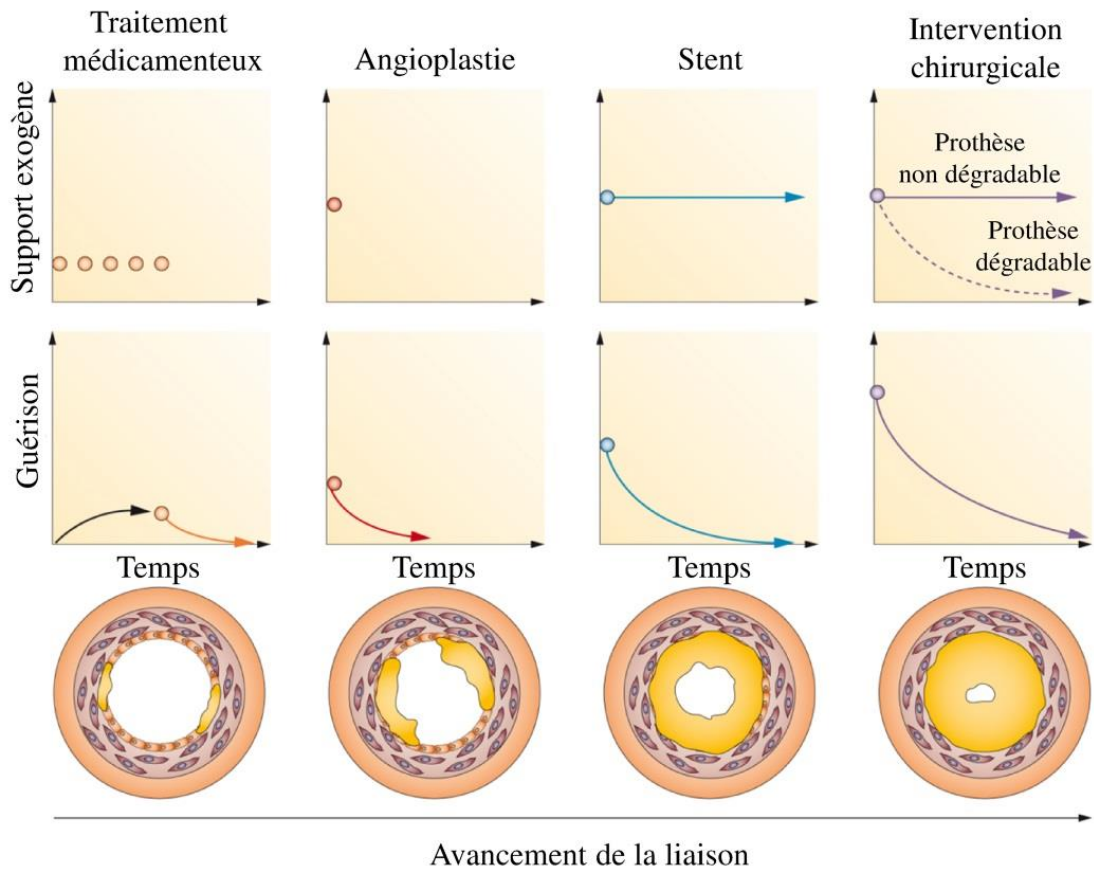


Figure 11. Progression de l'occlusion artérielle en fonction du traitement approprié (adaptée de [50])

Lorsque la plaque d'athérome est dans les premiers stades de sa formation, les médecins prescrivent généralement un traitement médical à base d'anti-inflammatoire (statine), d'anticoagulant (aspirine, héparine), des bêtabloquants ou des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine responsable de l'hypertension. Si ces médicaments ne suffisent pas à arrêter la progression de la plaque, l'intervention chirurgicale est inévitable, soit par angioplastie, soit, dans les cas les plus graves, par chirurgie classique.

Dans la suite de la thèse, les diverses méthodes chirurgicales pour soigner les maladies vasculaires ainsi que les matériaux utilisés dans le domaine des prothèses vasculaires seront présentées.

5.1 Angioplastie

L'angioplastie transluminale percutanée (Figure 12A) est une procédure chirurgicale peu invasive inventée dans les années 70 par Andreas Gruntzig qui consiste à faire passer un cathéter accompagné d'un ballonnet à travers l'artère sclérosée. Le ballonnet est ensuite gonflé pour repousser la plaque d'athérome et ainsi dégager la lumière de l'artère et rétablir la circulation sanguine [51]. Cette technique, suivie par des méthodes d'imagerie, est très utilisée aujourd'hui, car elle permet une intervention moins lourde et moins coûteuse en termes de temps d'hospitalisation.

La naissance de l'angioplastie a permis, dans les années 80, les premières implantations de stents détaillées dans la partie suivante, mais aussi de l'invention de l'athérectomie rotative dans les années 90 et sa démocratisation dans les années 2000. Cette procédure, alternative au ballonnet, consiste à faire passer dans les artères un guide muni d'une fraise rotative constituée de nickel et de la poudre de diamant appelée Rotablator® et de découper la plaque d'athérome en fines particules. Cette procédure est utilisée dans 2,2 % des cas d'athérosclérose en 2012 et est en hausse de 10 % par année.

5.2 Stents et endoprothèses vasculaires

Les stents, inventés peu après l'angioplastie par Julio Palmaz [51], sont des dispositifs tubulaires, maillés et implantés par angioplastie, qui permettent, lors d'une occlusion partielle du vaisseau par une plaque d'athérome, de maintenir l'artère ouverte afin que le sang circule normalement (Figure 12). L'ajout de ces stents dans la procédure d'angioplastie percutanée a permis de diminuer le taux d'échec de l'intervention. Par exemple, l'ajout d'un stent durant une angioplastie coronarienne transluminale percutanée permet de faire passer le taux d'échec de 30 %-40 % à 20 %-30 % après 6 mois [52]. L'acier inoxydable 316L et les alliages de cobalt-chrome sont les matériaux les plus utilisés pour les stents. Leurs propriétés mécaniques, en particulier leurs modules de Young et leurs limites d'élasticité permettent une déformation élastique lors de la procédure d'implantation.

Plus récemment, des stents à base d'alliages de nickel et de titane (Nitinol[®]) passivés ont vu le jour, tout d'abord pour leurs propriétés de mémoire de forme et d'élasticité exceptionnelle à 37 °C, mais aussi pour la stabilité de la couche d'oxyde de titane se formant à la surface. L'oxyde de titane améliore ainsi la passivité de ces dispositifs. De plus, le Nitinol[®] est détectable en imagerie par résonance magnétique ce qui n'est pas le cas de l'acier 316L et des alliages de cobalt et de chrome [52].

Une autre innovation apparue dans les années 2000 est le recouvrement de la surface des stents par des médicaments comme le Sérolimus[®], l'Everolimus[®] ou le Placitaxel[®]. Ces molécules sont des immunosuppresseurs ou des anticancéreux qui permettent d'empêcher la réaction immunitaire due à l'implantation d'un biomatériau ou la prolifération des cellules endothéliales et musculaires lisses à la surface du stent les premiers temps de l'implantation [52].

La dernière génération de stents apparus depuis 2010 est basée sur le principe du remodelage artériel. En effet, après l'implantation d'un stent, les cellules endothéliales ont tendance à migrer sur la paroi du stent, rétablissant les fonctions artérielles et rendant la présence du stent superflu. Dans le but d'éliminer le dispositif après la période de remodelage, des stents en polymères dégradables ont été créés. Le polymère de prédilection utilisé dans cette application est l'acide poly(L-lactique) (PLLA) pour un stent qui se dégrade *in vivo* de 3 à 6 mois. D'autres polymères comme le polycarbonate-tyrosine ou l'association du magnésium avec le PLLA sont actuellement au stade d'essais cliniques ou de recherche [53] tout comme de nouveaux métaux dégradables [54].

En 1991, un autre type de stent a vu le jour dans le but de soigner les anévrismes par chirurgie faiblement invasive. Ce stent, appelé endoprothèse, est composé d'une structure en métal recouvert par un tissu synthétique. Les matériaux composant le tissu peuvent être soit du polyéthylène téréphtalate (PET) ou du polytétrafluoroéthylène expansé (PTFE). Les dernières générations de ces dispositifs utilisent également du polyuréthane (PU) non tissé électrofilé.

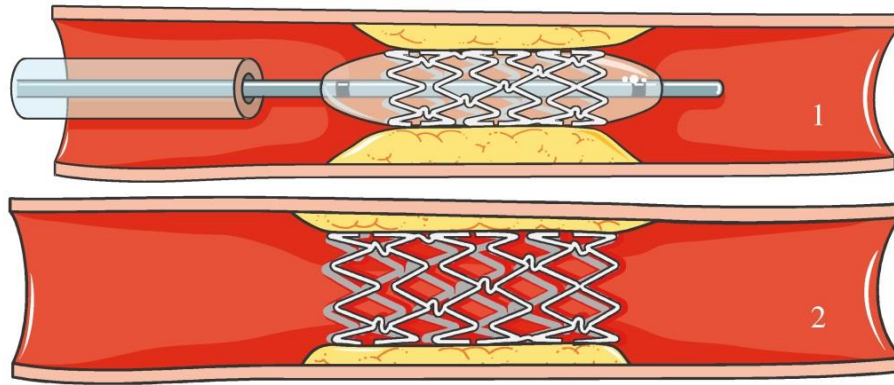


Figure 12. Description de l'angioplastie avec pose de stent

5.3 Prothèses vasculaires biologiques

Au début du XX^e siècle, Alexis Carrel montra la faisabilité de la transplantation d'organe, dont la greffe de vaisseau sanguin autologue, et développa les techniques de greffe par anastomose encore largement utilisées aujourd'hui. En 1949, la première autogreffe veineuse est proposée par Kunlin [55]. Cela consiste à remplacer par pontage un vaisseau sanguin par une veine, le plus souvent la grande veine saphène. Le taux de réussite de ces implants biologiques autologues, supérieurs à 18 % sur 3 ans [56] pour les pontages fémoro-poplités, est notablement supérieur que n'importe quel substitut vasculaire. Ce succès provient, tout d'abord, de la similarité des propriétés mécaniques, dont la compliance, mais aussi une surface entièrement endothélialisée et propre à l'individu procurant aux substituts une excellente hémocompatibilité. Cependant, la maladie vasculaire est le plus souvent systémique rendant les sites de prélèvements sains non disponibles, ce qui nécessite des alternatives. De ce fait, des implantations d'homogreffes veineuses et artérielles ont été initiées en 1951 par Jacques Oudot [57]. Toutefois, des études montrent que 49 % de ces substituts ont conduit à des anévrismes après 5 ans d'implantation.

La conservation des greffons par congélation s'est posée comme une explication à la dégénérescence des propriétés mécaniques de l'artère. Les chercheurs ont donc tenté de traiter des carotides de bœufs ou de veaux [58] ainsi que des veines de cordons ombilicaux

avec de la glutaraldéhyde afin de réticuler le collagène [59]. Cependant, toutes les homogreffes et les hétérogreffes ont été abandonnées, car les taux de réussite de ces substituts étaient trop faibles à long terme souvent mettant en cause la stabilité mécanique. Les autogreffes restent les meilleurs substituts pour leurs stabilités à long terme et leurs faibles taux d'échec [60]. Ils demeurent néanmoins peu disponibles, d'où la mise en œuvre de prothèses vasculaires synthétiques facilement implantables.

5.4 Prothèses vasculaires synthétiques

L'avènement des prothèses vasculaires synthétiques textile commença en 1952 lorsque Arthur Voorhees eut l'idée de remplacer l'aorte par une structure synthétique en toile de parachute (Vinyon N) cousue pour former des tubes [51]. Ces tubes ont été implantés chez une trentaine de chiens dont la plupart ont survécu plusieurs dizaines de jours avant d'être sacrifiés [61,62]. À la suite de cette découverte majeure, des matériaux comme le polyacrylonitrile (Orlon[®]), le polyvinyle alcool (Ivalon[®]), le polyamide 6-6 (Nylon[®]), le polyéthylène téréphtalate (Dacron[®]) et le polytétrafluoroéthylène (Téflon[®]) ont été utilisés sous forme tubulaire textile pour le remplacement de vaisseaux sanguins. Cependant, le Nylon[®], l'Orlon[®], le Vinyon N[®] et l'Ivalon[®] ont été rapidement abandonnés pour leur instabilité mécanique [63]. Dans les années 70 et 80, le polyuréthane (PU) devient un matériau de prédilection pour la fabrication de prothèse vasculaire. L'intérêt d'utiliser ce matériau réside dans ses propriétés mécaniques. En effet, les prothèses en PU ont une compliance proche des artères ce qui n'est pas le cas des autres polymères. Cependant, à long terme, ce polymère se dégrade en engendrant des produits de dégradation toxique. Ces prothèses ont été donc retirées du marché [64,65]. Ce polymère reste néanmoins intéressant en le copolymérisant. Aujourd'hui, le Dacron et le Téflon sont les matériaux synthétiques de prédilection utilisés pour le remplacement vasculaire.

5.4.1 Polytétrafluoroéthylène (PTFE)

Le PTFE a été commercialisé, pour la première fois, dans les années 1940 par la société Du Pont de Nemours sous le nom de Téflon[®] puis introduit comme substitut vasculaire en

1963 par Edwards sous la forme de structure textile. Suite à la déstructuration *in vivo* de cette structure textile, elle a très vite été abandonnée dans les années 70 pour faire place à une structure microporeuse appelée Gore-Tex[®]. Ces prothèses vasculaires en polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE) (Figure 13) sont fabriquées en compactant et extrudant du PTFE en solution, puis en effectuant un étirage thermomécanique. C'est ce dernier traitement qui donne la structure microporeuse ; les chaînes de polymère s'alignent et s'organisent sous forme de cristallites ce qui augmente la porosité. Les prothèses en ePTFE peuvent posséder un enrubannage ou une armature en PTFE solide qui permet de résister à la plicature.

Le ePTFE possède une excellente stabilité mécanique, mais aussi une grande hydrophobicité ce qui lui permet d'être moins thrombogène que les autres matériaux comme le PET. Néanmoins, les prothèses en PTFE n'ont aucune compliance et des propriétés d'élasticité très faibles. De par ces différentes caractéristiques, l'utilisation de l'ePTFE est préconisée dans le remplacement des artères de moyens et faibles diamètres (entre 10 mm et 5 mm). Selon certaines études [66], le taux de réussite de ces prothèses est de 61 % après 3 ans d'implantation et de 45 % après 5 ans pour des pontages fémoro-poplités.

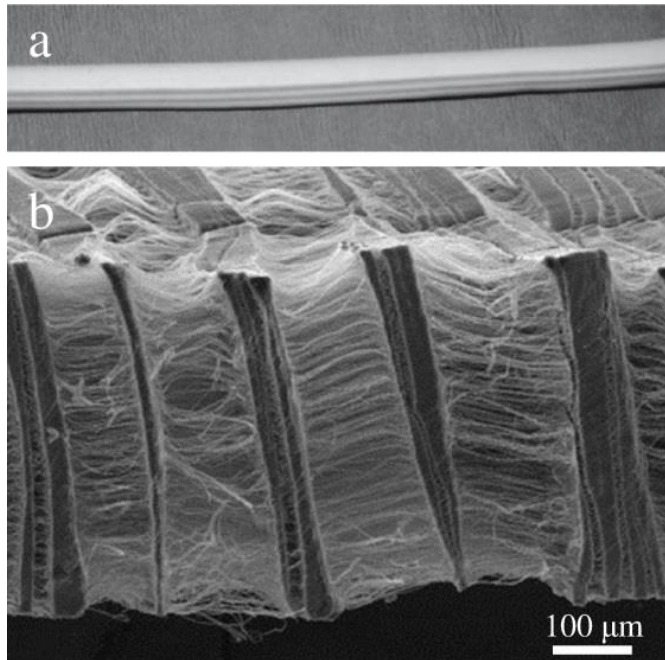


Figure 13. Structure des prothèses en ePTFE, **a.** Prothèse en ePTFE [60], **b.** Observation d'une coupe transversale d'une prothèse de ePTFE au microscope électronique à balayage [67]

5.4.2 Polyéthylène téréphtalate (PET)

Les fibres de PET connues sous le nom de Dacron[®] ont été commercialisées par la société Du Pont de Nemours en 1950. En 1958, un nouveau dispositif de tricotage développé par Thomas Edman permet la fabrication de tubes de PET tricotés de différents calibres possédant des bifurcations à l'image du système vasculaire. Il permit à Michael De Bakey de les implanter avec succès sur un grand nombre de patients au niveau de l'aorte thoracique, l'aorte abdominale et dans les artères périphériques [68]. Aujourd'hui, les prothèses textiles en PET sont soit tissées, soit tricotées et n'ont pas changé fondamentalement. Cependant, la création de fils texturés à la place de fils conventionnels sur la surface externe, conduisant à la conception de prothèses à effet velours, a amélioré de manière significative la cicatrisation. L'effet velours interne et externe n'a néanmoins pas porté ses fruits, car trop instable chimiquement et mécaniquement.

La fabrication des prothèses en PET commence par la production des fils de PET sous extrusion et étirage à une température proche de la température de fusion. Cet étirage permet d'orienter les chaînes de polymère et de favoriser la cristallisation. Ces filaments sont ensuite tissés ou tricotés pour former le tube de prothèse. Par la suite, une compaction chimique permet de rétracter le fil suivant la direction longitudinale et d'augmenter le diamètre du fil et donc l'étanchéité de la prothèse. La prothèse passe ensuite par une étape de gaufrage qui consiste à former le cosselage par mis en forme thermique. Les prothèses sont finalement nettoyées, imprégnées et stérilisées le plus souvent par irradiation gamma.

Les prothèses vasculaires sont, à cause de leur structure textile, perméables au sang. Par conséquent, les chirurgiens passent par une étape de précoagulation. Il s'agit de tremper la prothèse dans le sang et laisser le sang coaguler pour perméabiliser la prothèse avant de l'implanter. Pour éviter cette étape, les prothèses en PET conçues aujourd'hui sont imprégnées par des gels de collagène, de gélatine ou d'albumine. Ces gels, biodégradables, se dégradent entre 1 et 4 semaines et produisent les mêmes résultats que les prothèses précoagulées. Le taux de réussite des prothèses en PET est de 93% pour le remplacement de vaisseaux sanguins de grands diamètres comme l'aorte mais de 43 % pour les artères périphériques après 5 ans d'implantation [66]. Ces résultats montrent que les prothèses en PET sont majoritairement plus utiles pour le remplacement de grand diamètre comparé à l'ePTFE. Le PET est moins hydrophobe et montre à long terme une plus mauvaise stabilité chimique, néanmoins il montre des propriétés mécaniques plus proche des artères, améliorées par le cosselage.

Récemment, une nouvelle prothèse avec de l'héparine greffée à sa surface a permis d'obtenir de meilleurs résultats que les prothèses en ePTFE [69–71] (55 % de taux de réussite contre 43% après 3 ans pour des pontages fémoro-poplités ou infra-inguinaux. D'autres recouvrements ont été également utilisés comme l'argent, le carbone ou des polymères fluorés afin d'améliorer la résistance aux infections ou améliorer la stabilité chimique [72]. Une autre innovation portant sur les dimensions des prothèses en PET a permis d'améliorer leur compliance. En effet, des chercheurs ont démontré que la compliance des prothèses artérielles en PET est directement reliée à leur épaisseur. De

nouvelles prothèses plus fines ont donc vu le jour [73], mais le manque de résultats publiés ne permet pas de conclure sur une quelconque amélioration du point de vue médical.

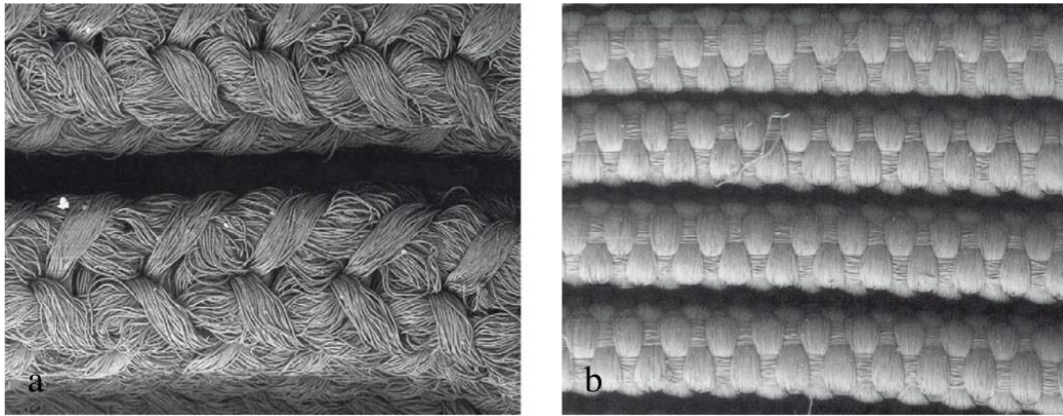


Figure 14. a. Surface interne d'une prothèse vasculaire en PET tricotée avec effet velours, b. Surface interne d'une prothèse vasculaire en PET tricotée (grossissement inconnu) [60]

6. Causes d'échec d'implantation

La biocompatibilité est définie comme la capacité d'un matériau, d'une prothèse ou d'un dispositif médical non viable, qu'on nomme biomatériau, à être en contact avec un tissu vivant en produisant une réponse immunitaire appropriée dans une application spécifique [74]. Cette application peut être le remplacement d'un organe ou d'une fonction d'un organe ou l'amélioration des fonctions d'un organe. Il faut comprendre que l'implantation d'un biomatériau est évaluée en taux de réussite, Équation complexe dépendant grandement des propriétés imparfaites des matériaux, mais aussi des patients et de leur prise en charge par le corps médical et la société [75].

La section précédente montre, en effet, que l'implantation de matériaux destinés à soutenir ou à remplacer les vaisseaux sanguins n'obtient jamais un taux de réussite de 100 %. Au contraire, le taux de réussite après l'implantation d'un matériau pour remplacer des vaisseaux sanguins de diamètres inférieurs à 6 mm peut être relativement faible, parfois inférieur à 50 % de réussite au bout de 10 ans. De plus, ces résultats sont d'autant plus

faibles que le diamètre du vaisseau est petit. De ce fait, il n'existe pas de prothèse durable sur le marché pour le remplacement des petits vaisseaux sanguins. Cette section a donc pour objectifs de comprendre les interactions entre les entités biologiques et les biomatériaux.

Lors d'une blessure vasculaire, le corps déclenche un processus inflammatoire normal. Ce processus, issu de l'hémostase (section 3.5), est initié par le contact entre les molécules du plasma sanguin et le collagène sous-endothélial conduisant à un caillot de fibrine et de plaquettes. Ce nouvel environnement composé de fibrine, mais aussi de cytokine, de mitogène, de chemoattractants et de facteurs de croissance constitue une matrice extracellulaire de substitution propice à la prolifération de cellules conjonctives. Des leucocytes, majoritairement des neutrophiles et des monocytes, sont donc recrutés par les cytokines. Les monocytes vont ensuite migrer par chimiotaxie et se différencier en macrophages. Les macrophages jouent un rôle central dans la reconstruction tissulaire [76]. Premièrement, avec les plaquettes, ils vont produire des facteurs de croissance contrôlant la migration, la différenciation et la prolifération des fibroblastes. Deuxièmement, avec les neutrophiles, ils vont transformer le caillot en bourgeon afin de le phagocyter. Finalement, avec les fibroblastes, ils participent au processus de reconstruction vasculaire ou de formation du tissu cicatriciel. Dépendamment de la taille de la blessure, le tissu reconstruit possède des propriétés plus faibles qu'initialement, car possédant moins de cellules.

Le processus inflammatoire face à l'implantation d'un biomatériau est différent.

6.1 Réaction inflammatoire face à un biomatériau

Immédiatement après l'implantation, le biomatériau se couvre de protéines non spécifiques par contact avec le sang. Les protéines adsorbées peuvent être de l'albumine, du fibrinogène, du kininogène ou des facteurs de coagulation et n'interviennent pas, pour la plupart, dans le processus inflammatoire normal. Par la suite, des échanges compétitifs et très dynamiques entre les protéines, appelés effet Vroman, induisent des changements d'environnement chimique, d'affinité des cellules avec les protéines adsorbées sur la

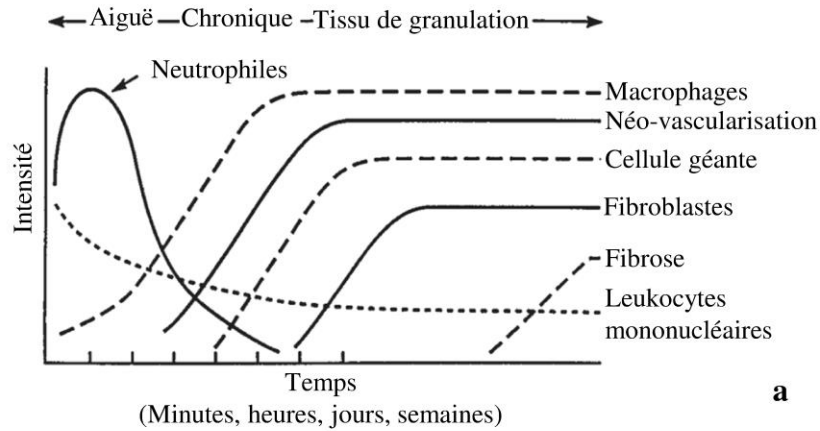
surface et ainsi régir le processus inflammatoire spécifique, mais aussi non spécifique dû à l'implantation d'un biomatériau décrit à la Figure 15 [76].

Après 30 min à 2 jours, la surface est colonisée majoritairement par des neutrophiles et des macrophages. Ces cellules vont relarguer des enzymes pour tenter de dégrader et de phagocyter le matériau. Au vu de la taille des implants comme les prothèses vasculaires et dû à leur durée de vie de quelques heures, les neutrophiles entrent rapidement en apoptose.

Après 2 à 10 jours d'implantation, le matériau se retrouve majoritairement colonisé par de nombreuses cellules (monocytes indifférenciés, des lymphocytes, des fibroblastes ou des cellules endothéliales) mais majoritairement par des macrophages intervenant de manière très importante dans le processus inflammatoire chronique, mais aussi dans la réaction immunitaire à un corps étranger ou biomatériau. En effet, ces cellules sécrètent un grand nombre de molécules entrant dans la prolifération et la migration des fibroblastes. Tentant de phagocyter le biomatériau, les macrophages, frustrés, fusionnent grâce à des médiateurs véhiculés par des lymphocytes pour former des cellules géantes multinucléées typiques de la réaction immunitaire face à un biomatériau. Ces cellules géantes libèrent des cytokines permettant, à partir de monocytes, le recrutement de nouveaux macrophages pour grossir leur taille. Leur action persiste pendant toute la durée vie de l'implant.

Après 3 semaines, les cellules multinucléées sont isolées par encapsulation fibreuse d'une fine couche composée de collagène et de constituants de la matrice extracellulaire produits par les cellules présentes comme les fibroblastes.

Il faut comprendre que ces processus complexes dépendent des caractéristiques initiales de la surface colonisée ce qui induit des changements relatifs dans les périodes des processus inflammatoires et dans la taille des cellules multinucléées ou de la couche fibreuse. Par exemple, les prothèses vasculaires textiles en PET seront composées de beaucoup de cellules multinucléées tandis que les surfaces en PTFE seront moins colonisées mais posséderont un plus grand contenu en collagène.



Après implantation chez un mammifère :

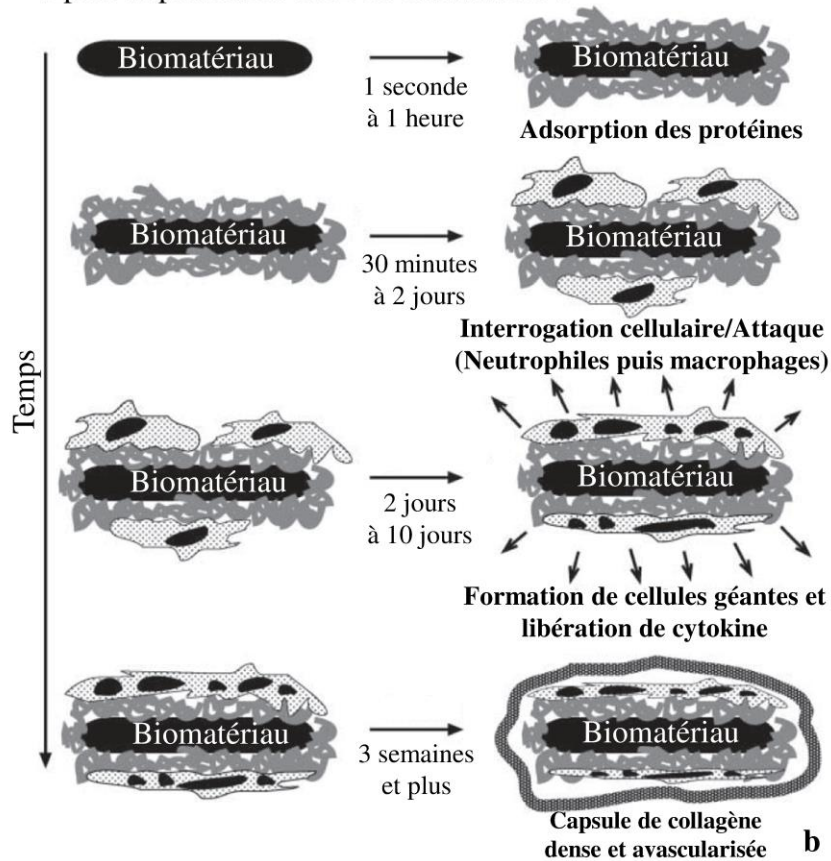


Figure 15. Réaction inflammatoire à un biomatériau, **a.** Variation temporelle de la réponse inflammatoire aiguë, chronique, de la formation d'un tissu de granulation et de la réaction à un corps étranger (adaptée de [76]), **b.** Réaction normale à un corps étranger (adaptée de [77]).

6.2 Resténose des prothèses vasculaires par thrombose

Immédiatement après l'implantation, un processus concomitant à la réaction inflammatoire se met en œuvre. Le fibrinogène présent à la surface de la prothèse est substitué par effet Vroman par du kininogène de haut poids moléculaire (KHPM) [78]. Par conséquent, le facteur XII présent dans le plasma s'active par contact entre le matériau des prothèses vasculaires présentant à la surface du KHPM [79]. Cette réaction entraîne la voie endogène de l'hémostase (Figure 6). Aux abords de la prothèse, c'est la voie exogène de la cascade coagulation qui est enclenchée. De plus, la substitution du fibrinogène est progressive ce qui signifie que du fibrinogène reste sur la surface permettant l'adhésion et l'activation des plaquettes à la surface du matériau. Tous les facteurs sont donc présents pour enclencher la cascade de coagulation et la formation d'un thrombus qui va obstruer la lumière de la prothèse. Finalement, les changements hémodynamiques à l'anastomose conséquence d'une faible compliance ainsi que des turbulences locales à l'intérieur du cosselage créent des zones d'irrégularités du flux sanguin pouvant être des moteurs de la coagulation [80].

6.3 Re-sténose des prothèses vasculaires par hyperplasie néointimale anastomotique

L'hyperplasie intinale est définie comme l'augmentation de la couche *média* du vaisseau sanguin résultat de la production de matrice extracellulaire et la prolifération des cellules musculaires lisses. Cette pathologie mal connue est souvent postopératoire et intervient, après l'implantation d'un stent ou d'une prothèse vasculaire, dans la région de l'anastomose [67]. En effet, dans la zone anastomotique, les différences de propriétés mécaniques entre l'artère native et le substitut [80] se traduisent par une disparité de la compliance [81], une grande contrainte de traction-compression cyclique non physiologique [82] et une contrainte de cisaillement local très faible provoquant une zone de stase du flux sanguin [80]. L'association de ces contraintes mécaniques, additionnées à la réaction inflammatoire, a pour conséquence la production de médiateur comme le *platelet derived growth factor*

(PDGF), un puissant médiateur de la prolifération des cellules musculaires lisses produit par les plaquettes activées ou les métalloprotéases (MMPs), protéases, participant au phénomène de remodelage artériel, produit par les leucocytes. L'expression ou la surexpression de ces médiateurs conduisent au changement phénotypique des cellules musculaires lisses [83] induisant la production de leur matrice extracellulaire, leur migration et leur prolifération aux abords de la prothèse.

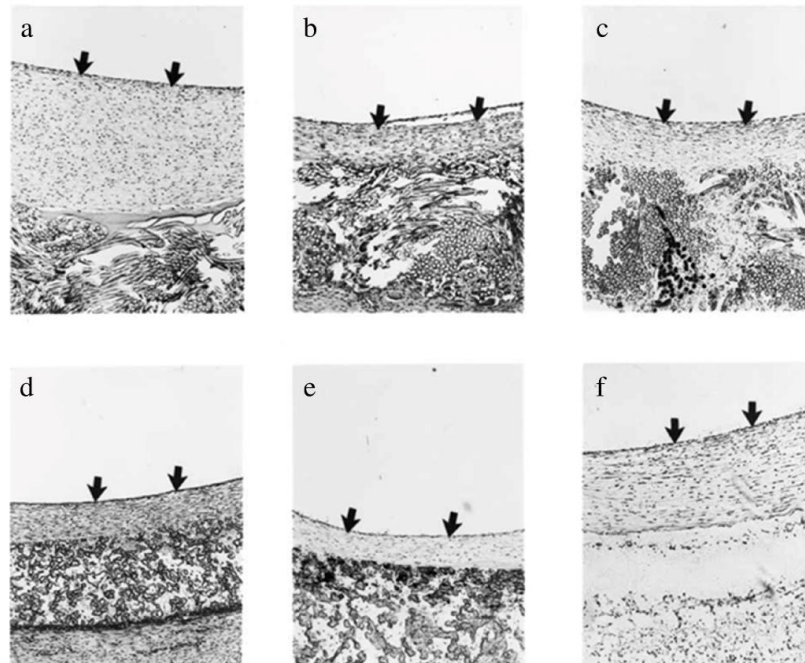


Figure 16. Hyperplasie intimale sur une prothèse en PET couverte de gélatine (a), une prothèse en PET couverte d'un polymère fluoré (b), une prothèse en PET plus récente couverte d'un polymère fluoré (c), une prothèse en ePTFE (d), une prothèse en ePTFE couverte de carbone (e), une prothèse en PU (f) [84]

6.4 Faux anévrismes anastomotiques

L'anastomose est le siège de thrombose, d'hyperplasie intimale, mais aussi de faux anévrismes. Cette cause d'échec postopératoire est également mal comprise, mais plusieurs facteurs en sont l'origine comme les disparités mécaniques entre les tissus natifs et synthétiques, les fils de sutures ou l'acte chirurgical [85] (Figure 17).



Figure 17. Faux anévrisme anastomotique [49]

6.5 Dégradation physico-chimique des prothèses vasculaires en PET

Après implantation, la prothèse est soumise à une contrainte cyclique de fatigue qui peut engendrer des complications à long terme. Le premier signe de dégradation mécanique est la perte de compliance radiale et longitudinale. En effet, dans des conditions *in vitro* on peut observer la perte du cosselage et une diminution drastique de la compliance après sollicitation dynamique pendant plusieurs jours. Ces effets sont probablement la conséquence d'une déformation plastique des filaments de PET lors des contraintes imposées qui peut conduire à une rupture précoce de ces filaments [86] (Figure 18.a).

La dégradation chimique se déclare à plus long terme sur les prothèses vasculaires textiles et peut se manifester par des déchirures dans des zones de faiblesse de la structure, identifiées comme étant les fils de remailage ou la ligne guide qui permet au chirurgien d'orienter la prothèse. Au niveau structural, une diminution de la masse moléculaire due à des coupures de chaîne de PET et donc une dégradation hydrolytique est mise en cause [49]. *In vitro*, ce phénomène apparaît à partir de 75 °C à pH neutre pour ce polymère *In vivo*, il est initié par la réaction inflammatoire ; les macrophages, afin de dégrader et phagocyter l'implant, produisent des protéases qui diminuent le pH local autour de l'implant [87] (Figure 18.b).

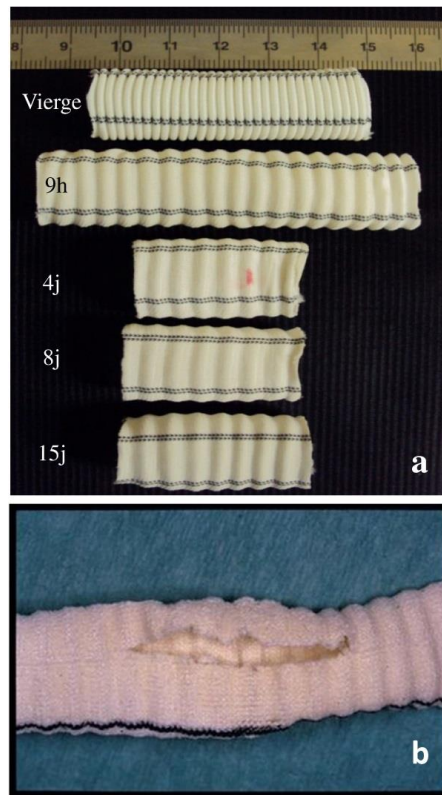


Figure 18. Dégradation des prothèses vasculaires **a.** Atténuation du cosselage après vieillissement mécanique *in vitro* [86] **b.** Rupture longitudinale d'un explant et perte du cosselage après 12 ans d'implantation [88]

6.6 Infections postopératoires

Les infections, contrairement aux pathologies postopératoires citées précédemment, ne sont pas dues aux performances de la prothèse, mais à des considérations externes comme l'acte chirurgical ou la stérilisation des implants et des instruments chirurgicaux. Les infections sont générées par l'infiltration d'un agent pathogène comme une bactérie, un champignon ou un virus pendant l'opération d'implantation. Ces pathologies surviennent dans 1 % à 6 % des cas d'opération impliquant les prothèses vasculaires. Cependant, parmi ces patients, 15 % à 75 % meurent de l'infection et 70 % sont susceptible de subir une amputation majeure [89]. Ces chiffres montrent bien que les infections restent un défi pour le corps médical et la prise en charge de patients.

6.7 Prothèses de petits diamètres

Les taux de réussite d'implantation de prothèses vasculaires relatés à la section 6.4 permettent d'établir un constat systématique quel que soit la prothèse : plus le diamètre des prothèses est faible plus le taux de réussite après implantation est faible. Ces observations sont majoritairement corrélées à des considérations hémodynamiques car les matériaux et les dispositifs médicaux utilisés restent sensiblement identiques. En effet, dans les artères de grand diamètre, les hauts débits pulsés permettent de disperser les facteurs et les produits de coagulation qui pourrait se former à la surface des prothèses vasculaires. Au contraire, dans les artères de plus faibles diamètres, le débit sanguin diminue et l'écoulement devient laminaire ce qui permet le déclenchement de l'hémostase.

7. Stratégies d'amélioration des substituts vasculaires

Les prothèses vasculaires synthétiques ont permis, des années 1950s à aujourd'hui, de prolonger considérablement la vie des patients. Cependant, ces substituts montrent des taux d'échecs relativement élevés, ce qui nécessite inévitablement des améliorations. De plus, la création de substituts viables pour le remplacement de vaisseaux sanguins de petits diamètres représente, à ce jour, le plus grand défi scientifique de la chirurgie vasculaire [90].

La multitude de propositions et de stratégies pour améliorer le taux de réussite à l'implantation montre bien la difficulté de comprendre les phénomènes complexes qui interviennent lors de l'implantation de prothèses artérielles et plus généralement de biomatériaux. Dans le domaine des biomatériaux vasculaires, l'enjeu principal est d'améliorer l'endothélialisation dans le but de régénérer l'endothélium vasculaire. De plus, un autre point de vue sur le sujet serait de recréer, par génie tissulaire, des vaisseaux sanguins pour palier au manque de substitut biologique disponible.

Le but de cette section est d'exposer les différentes stratégies permettant de créer les prochaines générations de substituts vasculaires, mais aussi de définir les objectifs à atteindre.

7.1 Le substitut idéal

Les observations et les recherches faites sur les prothèses vasculaires depuis les années 50s ont permis de comprendre l'évolution de ces substituts au cours du temps et leurs défauts. Ainsi, un cahier des charges peut être établi pour en définir des propriétés déterminantes pour le développement d'un nouveau substitut. Ces propriétés sont soit liées à l'interaction avec le milieu biologique et en relation avec la notion de biocompatibilité, soit en lien avec les propriétés mécaniques idéales du substitut, proche du vaisseau sanguin à remplacer. D'autres caractéristiques concernent l'industrialisation et la procédure d'implantation.

Le cahier des charges du substitut vasculaire idéal est le suivant [91] :

- **Assurer une bonne cicatrisation** : régénérer un tissu cicatriciel qui permet de stabiliser les interactions entre le sang et la prothèse.
- **Non cytotoxique** : N'a aucun effet délétère sur les cellules en contact avec le corps étranger. La toxicité est relative à la quantité des produits et à la durée du contact ou d'internalisation entre les cellules et le substitut [92].
- **Non allergénique** : Pas de déclenchement excessif et inadapté du système immunitaire. La détection d'allergie, si elle n'est pas recensée sur toute la population, dépend le plus généralement de la tolérance du patient [92].
- **Non cancérigène** : Le substitut ne doit pas induire une modification génétique des cellules conduisant à la formation de tumeurs malignes. Ces tumeurs sont caractérisées par une croissance excessive et une modification des fonctions des cellules facilitant la néovascularisation. La formation de cancer après l'implantation de biomatériaux est relativement rare [93].
- **Non thrombogène** : Ne doit pas conduire à la formation de thrombus (voir section 6.2).
- **Résistant à l'infection** : (voir section 6.6).
- **Résistant à l'hyperplasie intinale** : cette caractéristique (voir section 6.3) dont les mécanismes sont encore mal connus est en lien avec les propriétés mécaniques.

- **Compliant** : La compliance est la capacité de la paroi de la prothèse ou d'une artère à se déformer élastiquement sous la pression sanguine. Elle est caractérisée par le rapport entre le volume du substitut ou de l'artère et la pression exercée sur sa paroi. On distingue également la compliance diamétrale et la compliance longitudinale. La compliance est grande pour les grandes artères, mais devient faible pour les très petites artères. Lors de la conception d'un substitut, la compliance doit être la plus proche possible de l'artère à remplacer.
- **Élastique** : L'élasticité est la capacité d'un matériau à se déformer et à revenir à sa position initiale sans altération. Les matériaux utilisés dans les prothèses vasculaires doivent avoir un domaine d'élasticité relativement grand. Cette propriété est également liée à la compliance et à la faible dureté [94].
- **Résistant à la fatigue** : Des contraintes dynamiques appliquées sur la prothèse peuvent induire des déformations irréversibles sur sa structure.
- **Compatible avec les méthodes de stérilisation et de stockage** : Plusieurs technologies, comme la stérilisation par rayonnement ou par gaz, sont disponibles et normalisées afin de stériliser les dispositifs médicaux. L'utilisation d'une procédure de stérilisation ne doit pas engendrer de modification non contrôlée sur le dispositif [95].
- **Industrialisable** : Le dispositif médical doit pouvoir être produit en grande quantité et disponible pour la majorité des patients.
- **Disponible rapidement** : Par exemple, les accidentés de la route ont besoin d'une réparation vasculaire immédiate. De plus, les conduits doivent être disponibles sous plusieurs tailles.
- **Facile à manipuler et à suturer** : Le dispositif doit être implanté par des procédures médicales connues ou réalisables. Il faut savoir que les chirurgiens vont couper ou tirer sur la prothèse pour pouvoir l'implanter.
- **Faible coût pour le patient et la société** : La fabrication du dispositif doit être abordable tout comme la prise en charge du patient par l'hôpital, les assurances ou la société.

Aujourd'hui, il n'existe actuellement pas de substitut vasculaire possédant toutes ces propriétés.

7.2 Le paradigme de la néoendothélialisation

Les mécanismes d'endothélialisation *in vivo* des prothèses vasculaires ont été étudiés pendant plusieurs décennies. La croissance d'un endothélium à la surface des prothèses vasculaires permettrait au substitut d'être résistant à la resténose par thrombose ou par hyperplasie intimale.

L'endothélialisation *in vivo* peut suivre trois mécanismes. Tous d'abord, la migration et la croissance endothéliale peut être transanastomotique (Figure 20.a). Ensuite, l'endothélialisation peut être induite par déposition de cellules endothéliales circulantes progénitrices (EPC) formant des ilots sur la surface luminale de la prothèse. Finalement, l'endothélialisation peut également s'effectuer par les pores de la prothèse et sera appelé endothélialisation transmurale (Figure 20.b). Ces mécanismes se distinguent de l'endothélialisation *in vitro* et seront étudiés dans ce paragraphe.

7.2.1 Endothélialisation transanastomotique

La néoendothélialisation transanastomotique (figure 20.a) ou croissance du *pannus* est définie par la croissance de l'endothélium par l'anastomose après l'implantation d'une prothèse. Longtemps considéré comme l'unique mécanisme d'endothélialisation, les études d'implantation chez l'animal ont montré des résultats spectaculaires. L'endothélialisation des prothèses vasculaires, dite spontanée, était dans certains cas complète et rapide [96]. Cependant, ces études sont aujourd'hui obsolètes et critiquées parce que les prothèses utilisées étaient trop courtes, que les mécanismes d'endothélialisation étaient mal compris et que les modèles animaux utilisés étaient très éloignés de l'humain en termes de croissance endothéliale. À titre d'exemple, le temps de croissance des cellules endothéliales provenant de l'anastomose est 56 semaines chez l'humain, 4 semaines chez le singe et 3,5 semaines chez le chien [67] pour une même surface endothélialisée. D'autres études montrent que le *pannus* n'excède jamais 10 mm après 11 ans d'implantation chez

l'humain [96] ; ce chiffre étant dépendant de beaucoup de facteurs comme l'âge, la structure de la prothèse ou l'acte chirurgical. Les mécanismes sous-jacents sont peu connus, néanmoins, les cellules endothéliales humaines adultes ont une capacité de duplication d'environ 70 cycles ce qui limite considérablement la création d'un endothélium par voie anastomotique [97,98]. De plus, on peut noter que la croissance transanastomotique des cellules endothéliales est plus prononcée pour des prothèses en ePTFE que des prothèses en PET. Plus récemment, des prothèses plus longues implantées chez l'animal ont montré d'autres mécanismes d'endothélialisation, d'autres informations histologiques [99] et les précautions à prendre lors d'études chez les gros animaux (cochons, singes, brebis...) [67].

7.2.2 Endothélialisation par îlots

Le premier cas de ce type d'endothélialisation est exposé par Sauvage en 1975 [100]. Le patient, implanté d'une prothèse en PET de plus de 45 cm, présentait une réendothélialisation de 32% de sa paroi après 20 mois d'implantation (Figure 19). Les îlots de cellules endothéliales étaient éloignés du *pannus* ce qui sous-entend un mécanisme d'endothélialisation différent. Des observations similaires ont été rapportées par le même groupe jusqu'en 1998 [101], permettant la découverte de la plupart des mécanismes menant à cette endothélialisation. Les cellules endothéliales observées proviennent de cellules progénitrices circulantes (voir section 3.7) non différenciées issues la lignée hématopoïétique [102]. Ces cellules peuvent s'accrocher aux parois de la prothèse grâce à la présence de protéines favorisant l'adhésion cellulaire comme la fibronectine et proliférer sur la surface de la prothèse recouverte de fibrine, structure propice à la prolifération [103]. De plus, la faible quantité de surface recouverte est due à leur présence très limitée dans le sang (6 à 7 cellules/mL [104]). Néanmoins, elles peuvent être différenciées par les marqueurs CD34⁺ ou CD45⁻ et isolées des cellules sanguines afin de les cultiver in vitro [102]. Cette nouvelle source de cellules progénitrices est prometteuse dans la création d'un substitut néoendothélialisé.

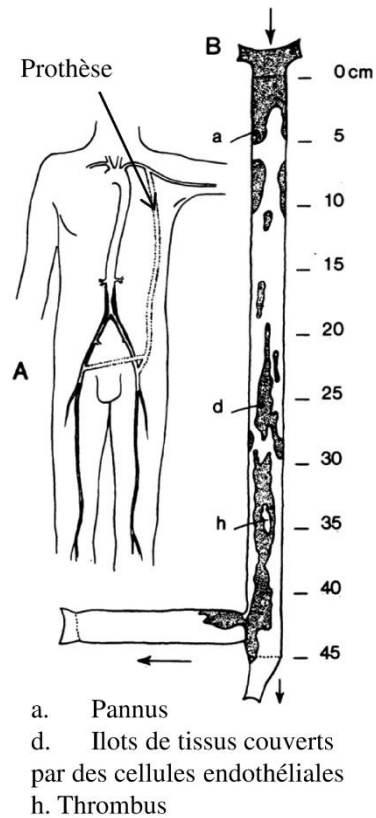


Figure 19. Cas d'implantation d'une prothèse en PET tricotée avec velours externe par pontage auxiliaire gauche-fémorale bilatérales (A) et ses zones endothélialisées (B) (adaptée de [100])

7.2.3 Endothélialisation transmurale

Le mécanisme d'endothélialisation transmurale des prothèses artérielles débute par la formation de capillaires provenant des tissus périphériques à la prothèse. Des observations chez le singe ont montré que ces capillaires pouvaient infiltrer les pores de la prothèse et ainsi coloniser la surface luminale de cellules endothéliales [98]. Cette angiogenèse à travers la paroi de la prothèse dépend de sa porosité. En effet, dans des structures en ePTFE microporeux, une taille de pores inférieure à 30 μm ne permet pas ce type de croissance (Figure 20.a) tandis qu'elle est possible pour une taille de pores supérieure à 45 μm [67] (Figure 20.b). En ce qui concerne les prothèses en PET tissées ou tricotées [67], le mécanisme d'endothélialisation est moins clair. Il semblerait que l'endothélialisation

proviendrait plutôt des EPCs, car la réaction inflammatoire provoquée par l'implantation engendre une couche trop dense de fibrine sur ce matériau. Les capillaires ne traversent donc pas totalement la paroi ; ils sont néanmoins présents à l'intérieur de celle-ci [105]. La différence entre l'humain et le modèle animal est également prononcée. La présence de capillaire chez le chien est observée entre 2 et 3 semaines après implantation tandis que chez l'homme elle est généralement absente ou, dans certains cas, présente après 5 mois d'implantation [67]. Par ailleurs, ce mécanisme est aujourd'hui le plus important chez l'homme comparé à l'endothélialisation transanastomotique ou par ilot.

Le mécanisme qui conduit à l'endothélialisation transmurale semble être intimement liée à la réaction inflammatoire. D'une part, un dépôt de fibrine peu dense permet d'améliorer la croissance endothéliale. Au contraire, si ce dépôt est trop dense il empêche l'infiltration des capillaires à la lumière de l'artère. D'autre part, les macrophages (ou monocytes) jouent, une fois de plus, un rôle central dans les interactions matériaux-cellules. Ils secrètent des *fibroblast growth factors* (FGF), moteur de la croissance de fibroblastes et des cellules endothéliales. Les fibroblastes sont les acteurs de la cicatrisation mais sont déterminants dans les mécanismes de revascularisation [106] et sont présents dans l'histologie des capillaires [67].

Les dernières études sur l'endothélialisation transmurale concernent de nouveaux protocoles chez le rat qui permettent de différencier l'endothélialisation transanastomotique de l'endothélialisation transmurale. Il s'agit d'implanter et d'isoler la prothèse à tester entre deux tubes de Téflon et former une boucle assez longue entre les deux anastomoses pour pouvoir séparer les deux mécanismes d'endothélialisation [107]. En effet, l'endothélialisation anastomatique étant le mécanisme prépondérant chez l'animal, cela permet de diminuer son effet et d'avoir un bien meilleur modèle qui se rapprocherait des implantations chez l'humain. Ces concepts ont été utilisés sur plusieurs prothèses en ePTFE avec des porosités différentes comme matériau modèle [107] mais aussi sur des dispositifs médicaux tubulaires à base de matrices décellularisées dans le but de les commercialiser [108].

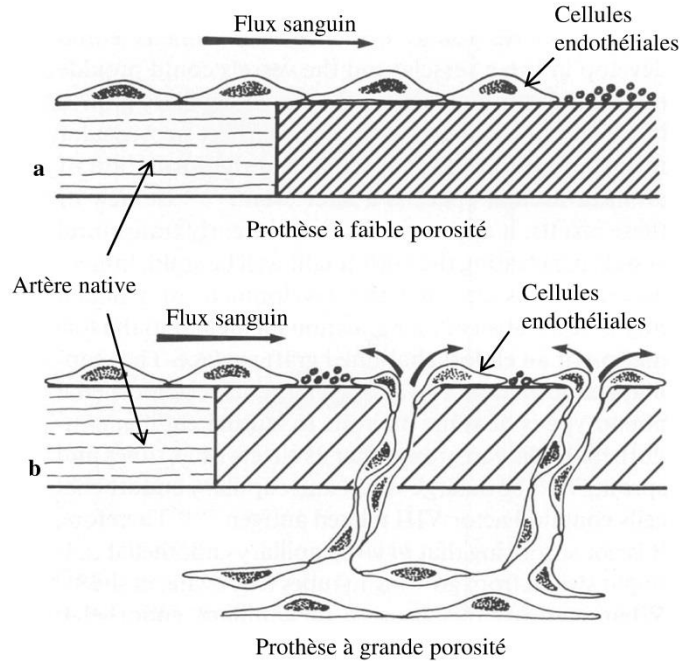


Figure 20. Mécanismes d'endothélialisation des prothèses vasculaires observés chez le singe, **a.** Endothélialisation transanastomotique pour des prothèses à faible porosité, **b.** Endothélialisation transluminale pour des prothèses à grande porosité. (adaptée de [98])

7.3 Modification de surface

Les propriétés de surface des biomatériaux sont capitales dans la bonne intégration du dispositif médical dans le corps. Dans le cas des biomatériaux vasculaires, ces modifications de surfaces ont des buts multiples, comme par exemple de contrer ou d'accélérer un élément du processus inflammatoire, d'améliorer la reconstruction endothéliale ou de stopper une pathologie postopératoire. Les techniques de modification de surface [109] ainsi que les molécules greffées [110] pour parvenir à ces résultats sont extrêmement variées et améliorent considérablement les propriétés des substituts. De ce fait, la plupart des prothèses ou des stents implantés aujourd'hui sont recouverts de biomolécules ou de médicaments ayant différents effets (section 5). Cependant, la plupart des dispositifs médicaux vasculaires vendus dans le commerce sont simplement recouverts de ces molécules soit par imprégnation en solution ou dans un gaz. Les liaisons chimiques entre la surface du matériau et la molécule sont donc faibles et ce recouvrement ne résiste

que très peu au flux sanguin ce qui limite considérablement son effet. Cette partie a pour but de présenter deux méthodes d'activation de surface ainsi que les stratégies les plus communes d'amélioration des propriétés de surface des substituts vasculaires par recouvrement ou greffage de biomolécules.

7.3.1 Généralités sur les traitements de surface par plasma

De manière générale, un plasma désigne un gaz ionisé ou partiellement ionisé électriquement neutre. Les plasmas sont présents partout dans l'univers ; le feu, la foudre, les aurores boréales ou les nébuleuses sont des exemples visibles dans la nature. Les plasmas, connus comme le quatrième état de la matière, peuvent donc être chauds ou froids, c'est-à-dire soit initiés par une source de chaleur soit par un champ électrique. Les plasmas produits par les réacteurs de laboratoire sont, en réalité, faiblement ionisés et constitués d'un mélange complexe d'ions, d'électrons, de photons, de radicaux, d'atomes et de molécules interagissant entre eux et avec la surface du substrat. Les espèces en présence ainsi que les sources diverses d'excitations et les conditions de traitement permettent une grande polyvalence des traitements de surface en agissant notamment sur la nature du plasma et l'énergie cinétique développée lors du bombardement de la surface par les composantes du plasma. En effet, les traitements par plasma permettent de déposer une couche mince de matériaux à la surface d'un substrat [111,112], de décaper la surface en modifiant la rugosité [113] ou d'insérer des réactifs permettant une possible fonctionnalisation en créant un lien covalent entre la surface et une molécule d'intérêt [114,115].

Les traitements de surface par plasma possèdent de nombreux avantages [109] :

- Ils sont peu coûteux et permettent de traiter un grand nombre de géométries complexes.
- Ils permettent de modifier la surface précisément et sur quelques nanomètres d'épaisseur.
- La modification de surface est uniforme, reproductible et durable.

- Il est possible de traiter tous types de surface (métaux, céramiques, polymères, composites).
- C'est une technologie très connue et bien documentée.
- La modification de surface peut être caractérisée et contrôlée par des méthodes usuelles.
- Les traitements plasma stérilisent les échantillons ce qui présente un intérêt pour les applications biomédicales.
- Les plasmas à pression atmosphérique permettent de s'affranchir d'un environnement sous vide. Le traitement est donc plus rapide, plus simple et applicable sur de grandes surfaces.

7.3.2 Généralités sur la polymérisation radicalaire par transfert d'atome à partir de la surface

La la polymérisation radicalaire par transfert d'atome à partir de la surface (SI-ATRP) est un cas particulier de polymérisation radicalaire contrôlée, vivante (sans réaction de transfert et de terminaison) et constitue une alternative à la fonctionnalisation de surface par traitement plasma appliquée aux polymères [116,117]. Cette réaction met en jeu un substrat polymérique déjà formé possédant un groupe terminal réactif, un initiateur à la réaction, un catalyseur et une molécule à greffer. L'initiateur est le plus souvent composé d'un groupe alkyle lié à un atome de la famille des halogènes, et peut être greffé à la surface du substrat ou être polymérisé à la fin de la chaîne du polymère du substrat. Le catalyseur est un complexe possédant un métal de transition qui va réagir avec l'initiateur pour former des radicaux libres à la surface du substrat [118]. Cette activation de la surface va permettre, par chimisorption, le greffage covalent de la molécule d'intérêt à partir de la surface du substrat.

7.3.3 Stratégie antiadhésive

Cette stratégie vise, par exemple, à limiter ou à modifier l'adsorption des protéines, éléments déclencheurs de la réaction inflammatoire à un biomatériau, et ainsi améliorer la

stabilité chimique de la surface ou passiver la surface et prévenir le risque de thrombose. Les molécules les plus utilisées sont les polyéthylènes glycols [119]. Ces polymères sont très biocompatibles, solubles dans les solutions aqueuses et très connus pour leurs propriétés hydrophiles ce qui leur octroie une très faible immunogénicité. L'immobilisation de polysaccharides [120] comme le dextrane [121] est aussi une stratégie tout aussi efficace pour prévenir l'adsorption des protéines ou des bactéries [122]. Les phospholipides comme la phosphorylcholine [123] ont, quant à eux, des propriétés limitant l'adhésion des plaquettes. L'oxyde d'azote (NO ou NOx) produit par les cellules endothéliales peut être greffé sur les surfaces. Ces composés préviennent l'agrégation des plaquettes, mais aussi de l'adsorption des leucocytes et de la prolifération des cellules musculaires lisses [124]. Le greffage de composés fluorocarbonés (CFx) limite également la thrombogénicité en mimant les propriétés du PTFE à la surface des matériaux [125].

L'immobilisation de ces molécules à la surface des matériaux améliore la résistance à la thrombose et à l'hyperplasie intinale, mais n'annule pas totalement l'adsorption des protéines car elles n'ont pas toutes les fonctionnalités des cellules endothéliales. De plus, ces composés n'interagissent pas avec les cellules de manière active et donc ne favorise aucunement l'endothélialisation.

7.3.4 Stratégie de biofonctionnalisation

Contrairement à la stratégie antiadhésive passive, la stratégie de biofonctionnalisation est plutôt adhésive, contrôlée et active. Dans le domaine des biomatériaux vasculaires, le principal enjeu est d'améliorer l'endothélialisation des prothèses ou endoprothèses en immobilisant des molécules à la surface et mimer des fonctions de la matrice extracellulaire dans le but de favoriser l'adhésion, la migration et la prolifération des cellules endothéliales adultes ou progénitrices circulantes [126,127] (EPC) recrutées depuis la moelle épinière (Figure 21). Les molécules immobilisées à la surface ont donc pour but de communiquer avec les cellules par des liens biochimiques. Par exemple, le greffage de peptides RGD améliore l'adhésion des cellules endothéliales [128,129] et permet d'immobiliser des cellules à la surface des substituts. Une autre stratégie d'amélioration de l'adhésion

cellulaire concerne l'immobilisation d'une protéine complète de la matrice extracellulaire [110] comme la fibronectine [130], de la vitronectine [131], le collagène de type I, la laminine [132] ou la thrombospondine. En effet, ces protéines possèdent des séquences similaires du peptide RGD, mais aussi d'autres peptides responsables de différentes fonctions cellulaires pouvant travailler en synergie avec le peptide RGD. Cependant, l'arrangement spatial de ces molécules de haut poids moléculaire coordonne leurs actions sur les cellules et donc joue un rôle important sur le comportement cellulaire. Il est donc nécessaire de pouvoir modifier leurs orientations, leurs densités ou leurs conformations [133].

D'autres exemples intéressants résident dans l'immobilisation de facteurs de croissance comme le VEGF [134,135] ou le FGF [136] améliorant l'expansion des cellules endothéliales et la vascularisation.

Les propositions de fonctionnalisation de surface sont très nombreuses et encourageantes dans la création de prothèses vasculaires hémocompatibles et plus stables dans le temps cependant, certaines de ces solutions sont irréalisables au niveau industriel à cause des coûts des matériaux, des processus de fabrication ou des technologies encore trop peu démocratisées.

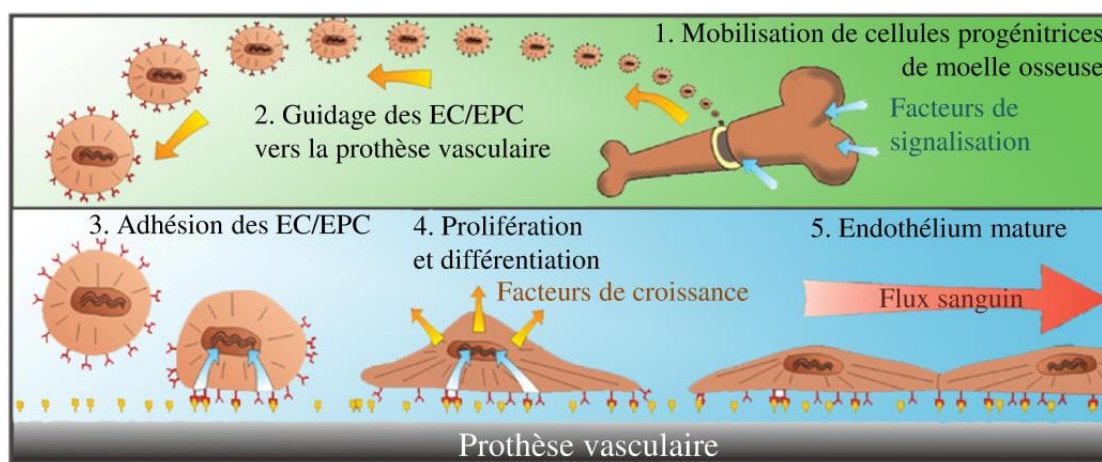


Figure 21. Endothélialisation *in situ* (adaptée de [127])

7.4 Ingénierie tissulaire vasculaire

Le terme *tissue engineering* a été introduit par la Fondation Nationale pour la Science américaine en 1987 [137,138] mais pleinement défini en 1993 comme étant un domaine interdisciplinaire qui applique les principes de l'ingénierie et des sciences de la vie dans le but de développer des substituts biologiques qui restaurent, maintiennent ou améliorent la fonction d'un tissu [139]. Les concepts d'ingénierie tissulaire définissent trois composantes principales intimement liées pour former un organe fonctionnel : un échafaudage, support de la croissance cellulaire, des cellules provenant d'animaux ou d'humains, et des signaux, permettant la croissance de l'organe [97]. En ingénierie tissulaire vasculaire, la plupart des études ont pour but de recréer des vaisseaux sanguins en laboratoire et se dissocient de l'amélioration des prothèses synthétiques existantes. Cette section a pour objet de définir les différentes stratégies pour obtenir un vaisseau sanguin par ingénierie tissulaire.

7.4.1 L'échafaudage

L'échafaudage constitue le support bidimensionnel ou tridimensionnel sur ou dans lequel les cellules auront la possibilité d'adhérer et proliférer afin de former un tissu fonctionnel. Il doit donc avoir des propriétés similaires aux matrices extracellulaires natives. Les biomatériaux utilisés sont très variés et peuvent être des polymères synthétiques ou naturels. Cependant, la mise en forme de ces polymères en échafaudage fonctionnel est un caractère essentiel permettant l'accroissement cellulaire.

Il existe plusieurs stratégies pour former un échafaudage permettant la croissance d'un vaisseau sanguin. La première approche, appelé technique d'autoassemblage, consiste, tout d'abord, à faire croître des feuillets de cellules musculaires lisses et de fibroblastes pendant 30 jours en pétri dans un milieu contenant de l'acide ascorbique ce qui permet d'accroître la production de matrice extracellulaire. Une fois mature, ces deux feuillets sont décollés et assemblés en les roulant autour d'un mandrin pour former un tube qui est ensuite endothélialisé [50,140]. Cette technique a permis de créer le premier vaisseau sanguin par ingénierie tissulaire en 1998 [141]. Récemment, cette même prothèse a été implantée en

tant que fistule artério-veineuse et montre de bons résultats cliniques chez l'humain après 9 mois d'entreposage et 11 mois d'implantation [97,142]. Cette technique permet d'obtenir un substitut entièrement biologique diminuant clairement les risques de resténose. Cependant le temps de fabrication est très long ce qui nécessite d'améliorer ce concept.

Une deuxième approche consiste à utiliser des matrices extracellulaires provenant d'organes décellularisés d'humains ou d'animaux. Ces échafaudages possèdent la plupart des protéines permettant une recellularisation avec, par exemple, les cellules d'un patient. Les substituts décellularisés peuvent être facilement conservés et la recellularisation est moins longue que la fabrication de vaisseau sanguin par auto-assemblage. De plus, la grande disponibilité des matrices décellularisées animales a permis l'obtention de produits commerciaux. Cependant, l'utilisation des produits de lyse des cellules peut détruire des composants essentiels de la matrice. Finalement, l'utilisation de produits animaux sur l'humain n'est pas exempte de transmission de maladie et nécessite des essais cliniques qui, jusqu'à maintenant, n'ont pas donné de résultat concluant à long terme [50,143,144].

Une dernière approche consiste à former un échafaudage tubulaire, d'ensemencer des cellules humaines à l'intérieur puis de laisser le substitut en bioréacteur afin de créer une *média* fonctionnelle et de former l'*adventice* et l'*intima* (Figure 22). Les matériaux naturels les plus utilisés sont les gels de collagène, constituants essentiels de la matrice extracellulaire, et de fibrine, connue pour favoriser la croissance des cellules [140,144]. Ces matrices à base d'hydrogels ont montré des faiblesses en termes de propriétés mécaniques et ont été réticulées ou renforcées par des structures synthétiques [144].

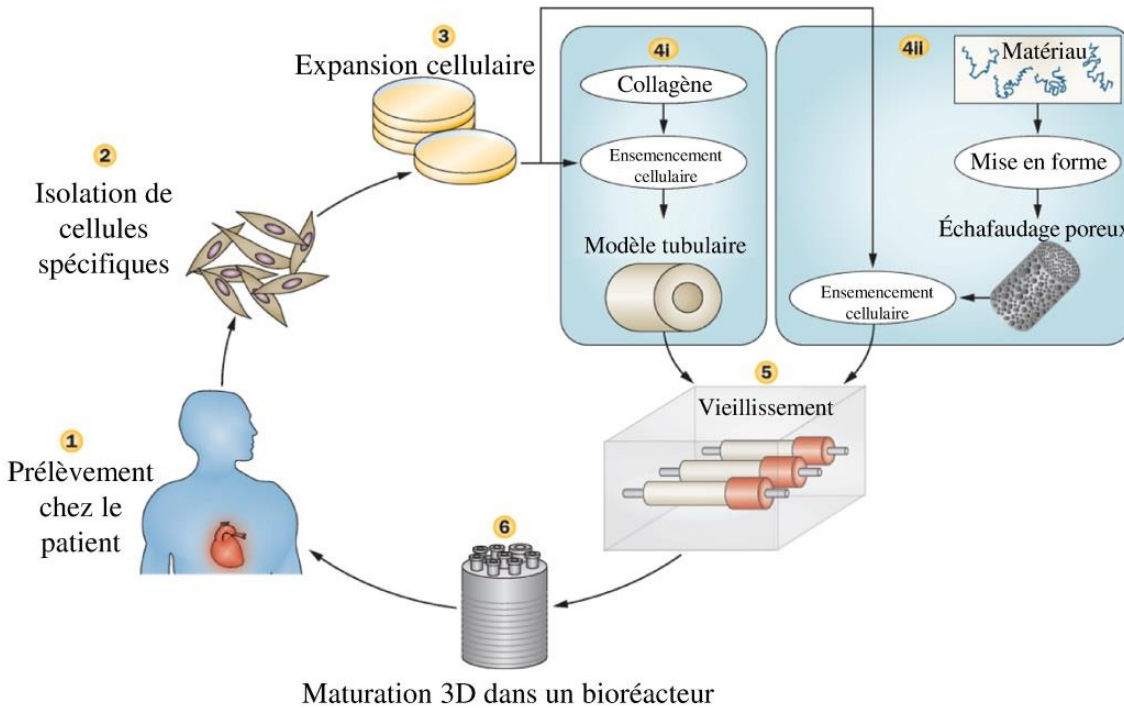


Figure 22. Stratégie d'ensemencement d'échafaudage pour la création de vaisseaux sanguins par ingénierie tissulaire (adaptée de [50])

L'alternative aux matériaux naturels réside dans la création de structures poreuses synthétiques et biocompatibles. Ces échafaudages, contrairement aux matériaux naturels, peuvent avoir des propriétés ajustées aux besoins et sont facilement mis en forme. Le premier échafaudage formait une structure tubulaire implantable en acide polyglycolique [145]. Aujourd'hui, un grand nombre de matériaux sont utilisés le plus souvent sous forme de nanofibres électrofilées [146]. La dégradation est également une autre propriété importante pour le développement de vaisseaux sanguins par génie tissulaire qui sera abordée plus loin dans le texte. Un exemple des dernières recherches probantes dans ce domaine concerne la conception et l'implantation d'un échafaudage de microfibres d'acide polylactique-co-glycolique dans une matrice microporeuse d'acide polylactique-co-caprolactone [147]. Cet échafaudage dégradables multiéchelle a été au préalable colonisé par des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (BMCs) puis implanté chez une souris dans le but d'un recrutement des cellules endothéliales et musculaires lisses

matures par remodelage. Les BMCs sécrètent des chemoattractants (MCP-1) qui permettent le recrutement des monocytes. L'infiltration des monocytes dans l'échafaudage a pour effet la sécrétion de VEGF et de cytokine recrutant d'une part, les cellules endothéliales soit par endothélialisation transmurale ou par îlots et d'autre part, les cellules musculaires lisses par migration transanastomotique. Finalement, les monocytes quittent ensuite l'échafaudage par sa dégradation [148] (Figure 23).

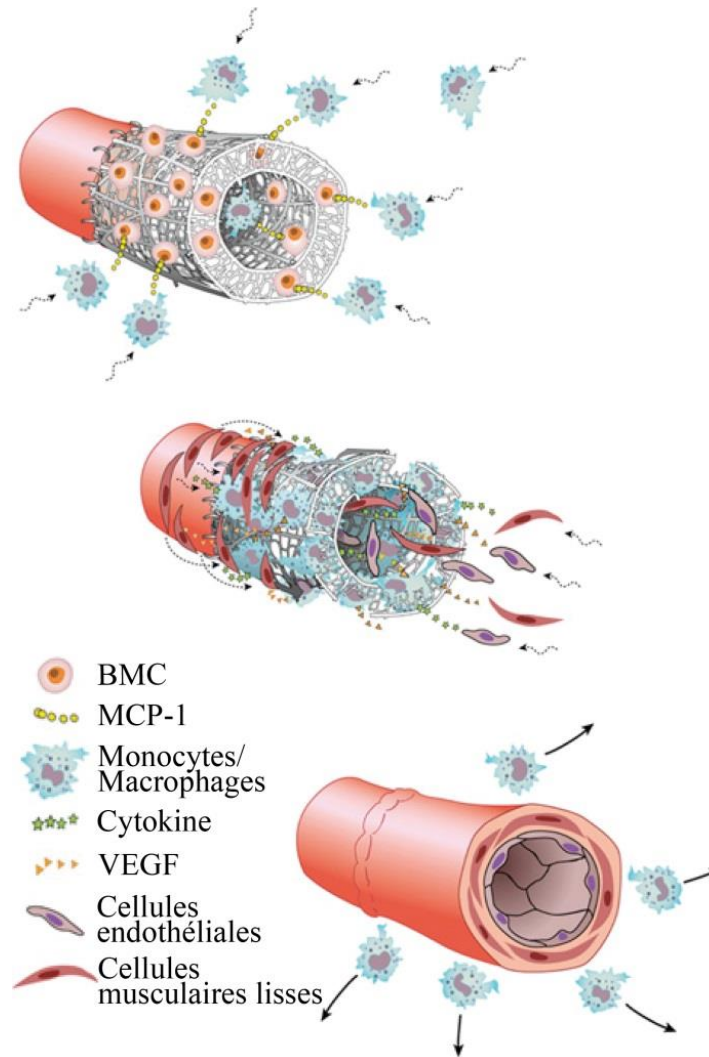


Figure 23. Concept de remodelage artériel dans un échafaudage dégradables ensemencé par des cellules souches (adaptée de [148])

7.4.2 Les cellules

Les cellules des vaisseaux sanguins adultes ont l'avantage d'être rapidement disponibles, déjà fonctionnelles et facilement prélevées à partir de donneurs humains ou d'animaux. Ces cellules peuvent provenir de l'aorte d'un bovin ou de la veine saphène d'un humain. Dans la plupart des paradigmes d'ingénierie tissulaire, ces cellules adultes sont prélevées à partir du patient et incorporées dans un échafaudage pour produire le vaisseau sanguin. Cependant, les cellules matures d'un donneur ont des capacités limitées de prolifération et de synthèse de la matrice extracellulaire [149]. Ce constat peut conduire à des maladies postopératoires mais aussi à une diminution de propriétés mécaniques attendues au départ.

Plus récemment, le domaine de l'ingénierie tissulaire s'est orienté vers l'utilisation des cellules souches multipotentes et pluripotentes. Les cellules souches multipotentes représentent une source du renouvellement cellulaire présent chez l'adulte et sont déjà engagées dans une lignée. Elles sont présentes dans la moelle osseuse, dans le cordon ombilical, dans le tissu adipeux, dans les muscles, dans le sang et dans les follicules pileux [150]. Contrairement aux cellules adultes, elles peuvent proliférer indéfiniment et certaines sont caractérisables et différenciables en cellules endothéliales, musculaires lisses et fibroblastes [150]. Les cellules pluripotentes sont, quant à elles, embryonnaires et non déterminées vers une lignée mais leur utilisation est très limitée par les comités d'éthiques.

Il existe également plusieurs stratégies d'ensemencement des cellules. L'ensemencement *in vitro* est le plus discuté dans la littérature [151] et a pour but de fabriquer le substitut vasculaire en incubateur. Une autre stratégie réside dans l'ensemencement *in vivo*. Il s'agit d'utiliser le corps comme incubateur dans le but d'ensemencer un échafaudage avec des cellules non vasculaires et de l'implanter par la suite [152]. On distingue également ces stratégies de l'ensemencement *in situ* qui a pour avantage d'implanter un produit non biologique qui sera par la suite cellularisé *in vivo* par exemple par des cellules endothéliales circulantes par l'intermédiaire de signaux biochimiques [152].

7.4.3 Les signaux

Les signaux ont pour but de stimuler l'attraction ou la croissance des cellules, la production des composants de la matrice extracellulaire ou l'organisation cellulaire afin de produire un tissu mature et fonctionnel. Le signal peut venir d'une molécule biochimique, greffée sur une surface ou incorporée dans un gel. On distingue les signaux biochimiques, présenté à la section 7.3 des signaux mécaniques ou électriques. En effet, le flux physiologique sanguin a un rôle fondamental *in vivo* dans le comportement des cellules endothéliales. Il est responsable de la mécanotransduction et intervient dans l'angiogenèse ou la régulation du phénotype. La modélisation et la production de ce flux par un bioréacteur, *in vitro*, sont donc des étapes essentielles à la maturation d'un vaisseau sanguin ensemencé de cellules. Beaucoup de bioréacteurs ont été conçus pour toutes sortes d'applications dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Cependant, peu arrivent à s'approcher des conditions physiologiques réelles. Tout d'abord, l'utilisation d'une pompe péristaltique est très courante [153], car elle produit facilement un flux pulsé, mais ne reproduit que très approximativement les caractéristiques physiologiques attendues. L'ajout d'une chambre de compliance aux systèmes prend en compte, en plus de la pulsation, la dépendance temporelle de la force de pression. Néanmoins, le couplage d'une pompe péristaltique avec une chambre de compliance ne suffit pas à recréer un flux sanguin physiologique. Afin de contrôler des valves cardiaques, des appareillages plus sophistiqués ont vu le jour. Brièvement, ces pompes, dites ventriculaires, simulent un battement cardiaque au moyen du contrôle de la flexion dynamique d'une membrane grâce à une pompe à air [153,154]. Les flux et les pressions rapportés sont très proches de la réalité. Les différences entre ces pompes résident dans la conception, le modèle mathématique choisi ainsi que dans son contrôle.

Les défis liés à l'ingénierie tissulaire poussent les scientifiques à chercher des compétences hors de leur champ d'expertise. Plus les recherches de ce domaine pluridisciplinaire avancent, plus les chercheurs se rendent compte des écarts entre le dispositif de laboratoire très imparfait, la compréhension très complexe du vivant et l'industrialisation à grande échelle et à faible cout. De plus, des questions hors du champ scientifique et technologique restent en suspens sur la normalisation des substituts. De plus, des questions éthiques et

sociétales se posent en ce qui concerne l'utilisation de cellules souches. Finalement, l'utilisation de produits issus de l'ingénierie tissulaire remet en cause des procédures hospitalières et de prise en charge des patients déjà acquis. Toutes ces limites à l'utilisation des substituts restent un frein pour la plupart des stratégies en ingénierie tissulaire.

8. Proposition d'une solution

Le but de cette section est d'exposer le contexte du projet en résumant les travaux précédents à cette thèse codirigés par le LPMT et le LIS concernant l'optimisation de la structure textile des prothèses vasculaires [1]. Les premiers travaux sur l'endothélialisation des prothèses vasculaires sont donc résumés pour mettre en contexte l'optimisation proposée par nos laboratoires.

8.1 Pré-endothélialisation des prothèses vasculaires

8.1.1 Endothélialisation *in vitro* des prothèses vasculaires

Le concept d'endothélialisation des prothèses vasculaires a été démontré dans plusieurs études cliniques ces 30 dernières années [155]. Tout d'abord, une première stratégie en une étape fut proposée afin d'endothélialiser les prothèses en ePTFE. Il s'agissait de récolter les cellules du patient, de les ensemercer sur les prothèses en ePTFE couverte soit de sang, de gel de fibrine ou de plasma sanguin, et d'implanter ces prothèses directement chez le patient. Ces essais ont permis d'améliorer le taux de réussite après 1 an, mais montraient tout de même des résultats mitigés à cause de la délamination des cellules endothéliales par le flux sanguin [155]. Grâce à ce constat, les chercheurs ont pris en compte qu'il fallait laisser les cellules endothéliales pour qu'elles murent et deviennent confluentes. Pour ce faire, une étape supplémentaire après endothélialisation *in vitro* a été rajoutée pour permettre aux cellules de fabriquer leur matrice extracellulaire et de résister au flux sanguin. Les résultats de remplacement d'artères femoro-poplitées par des prothèses en ePTFE encemencées de cellules endothéliales ont montré des taux de réussites supérieurs à 70 % pour des prothèses de 7 mm de diamètre et supérieurs à 60 % pour des prothèses de 6 mm de diamètre. Cette étude, comportant plus de 400 patients humain, montre un bénéfice

important de la présence de cellules endothéliales sur la paroi des prothèses vasculaires [156].

Plus récemment, des EPCs ont étéensemencées sur les prothèses vasculaires en ePTFE et en PET. Ces études ont montré une meilleure réactivité des EPCs aux stimuli mécaniques par rapport aux cellules endothéliales matures [157].

Cependant, l'adhésion des cellules endothéliales est une étape clé pour la prolifération des cellules endothéliales. Les précédentes études ont montré un réel bénéfice de faire proliférer des cellules endothéliales sur la surface des prothèses artérielles. Cependant, cette méthode pose la question de la bonne adhésion des cellules endothéliales sur les surfaces hydrophobes des matériaux utilisés en chirurgie vasculaire non propice à un attachement durable des cellules endothéliales.

8.1.2 Effet de la structure des prothèses vasculaires sur l'endothélialisation

Au vu des résultats d'enthélialisation *in vitro* sur des prothèses vasculaires en ePTFE, une première question soulevée par le LIS et le LPMT concerne l'influence de la structure textile des prothèses en PET sur la pré-endothélialisation. Une analyse des interactions entre structure des prothèses en PET et adhésion et prolifération des cellules endothéliales a permis une meilleure compréhension des phénomènes structurels des prothèses mis en cause. Pour ce faire, la prolifération et l'adhésion des cellules endothéliales ont été comparées sur cinq structures en PET (deux textiles tissés, deux textiles tricotés et un film) *in vitro* [158]. Les résultats ont montré que l'adhésion des cellules endothéliales était meilleure sur les structures textiles des prothèses vasculaires commerciales. Cependant, les cellules ne proliféraient pas en monocouche à l'image de l'artère native, mais plutôt dans la structure tridimensionnelle de la prothèse, le long des fibres (Figure 24) ou au travers du textile. Ceci implique qu'une telle prolifération pourrait n'avoir aucun effet sur la résistance à la thrombose de la prothèse. En effet, les cellules arrivant à confluence au bout de 15 jours ne prolifèrent pas en monocouche mais de manière chaotique et ne formeraient pas un endothélium pleinement fonctionnel. L'échelle micrométrique, néanmoins trop grande, de

la structure fibreuse (diamètre égal à 13 μm) et des pores (la largeur entre les fibres d'une prothèse tissées est égale à 30 μm) des prothèses tissées comme tricotées en sont principalement la cause. Il est donc nécessaire de concevoir une structure adaptée à la taille des cellules endothéliales (diamètre égal à 8 à 10 μm).

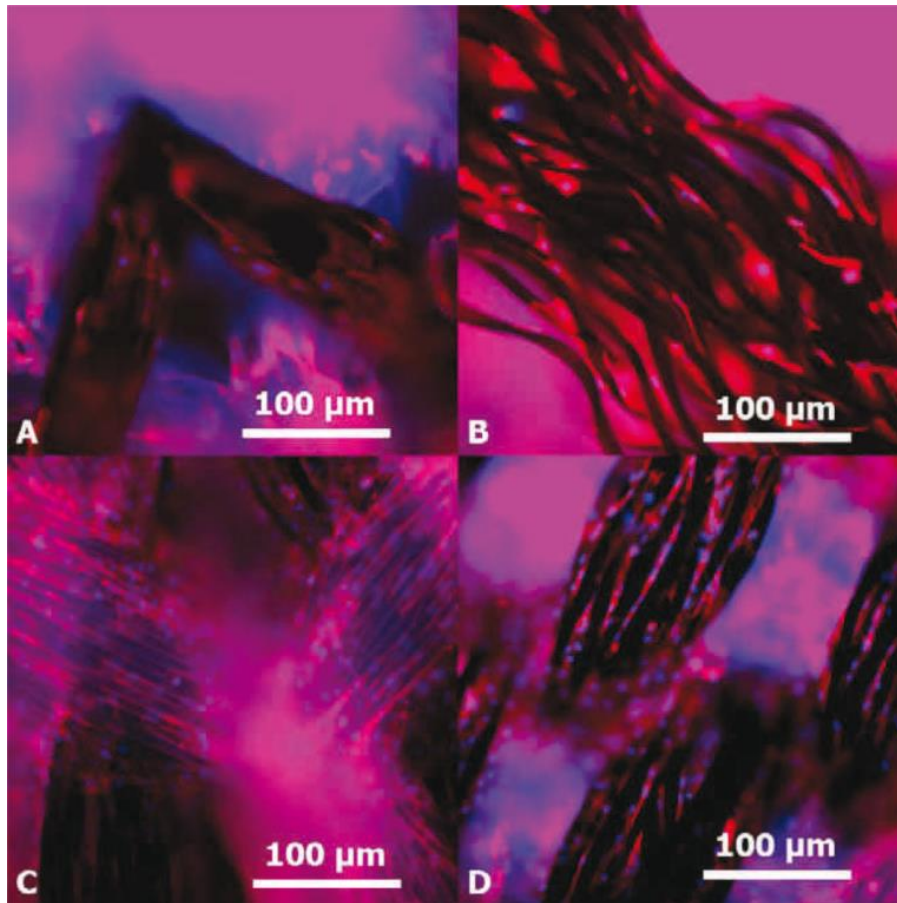


Figure 24. Structures textiles de prothèses vasculaires (filaments noirs) avec des cellules endothéliales photographiées au microscope à fluorescence après 5 jours de prolifération. Les filaments d'actine et les noyaux des cellules sont respectivement marqués à la rhodamine-phalloïdine (couleur rouge rosée) et au DAPI (couleur bleue). A : prothèse tissée avec effet velours (Biomateriali[®]) ; B : prothèse tricotée avec effet velour (Biomateriali[®]) ; C : prothèse tissée (Cardial[®]) ; D : prothèse tricotée (Cardial[®]) [158].

Les études de pré-endothélialisation des prothèses vasculaires montrent bien la nécessité de créer une interface qui permet à la fois l'adhésion des cellules endothéliales et la prolifération en monocouche des cellules endothéliales. Ces conditions *sine qua non* permettraient une prolifération et une rétention durable des cellules endothéliales vers la formation d'un endothélium fonctionnel sur les prothèses vasculaires.

8.2 Effet du recouvrement d'un échafaudage de nanofibres d'acide polylactique sur l'endothélialisation des prothèses vasculaires

Afin de permettre une prolifération en monocouche des cellules endothéliales sur des structures textiles, il était nécessaire de concevoir un appareillage capable de fabriquer une structure textile d'échelle inférieure au micromètre permettant le recouvrement des prothèses vasculaires. L'appareillage en question, conçu initialement au LIS et appelé filage par jet d'air, permet de fabriquer des textiles de nanofibres non-tissés. Une étude publiée en 2009 [159] exposa, pour la première fois, la technique du filage par jet d'air et le bénéfice d'utiliser une interface de nanofibres pour l'endothélialisation des prothèses vasculaires textiles. Tout d'abord, la technique du filage par jet d'air, qui sera plus détaillée dans le chapitre IV, est décrite comme un moyen de production de nanofibres par l'étrirage d'une solution polymérique grâce à un flux d'air à haute vitesse. Ensuite, une analyse d'image des échafaudages de nanofibres d'acide polylactique a permis d'une part, de déduire que les fibres possédaient un diamètre entre 200 nm et 400 nm et, d'autre part, d'étudier de manière préliminaire la rupture des fibres en fonction de certains paramètres de filage. Finalement, les échafaudages ont été pulvérisés sur des surfaces textiles de prothèses vasculaires etensemencés de cellules endothéliales. Ces échantillons ont été comparés à des prothèses vierges, mais aussi à des films, comme contrôles pour la prolifération en monocouche. Les résultats ont montré que les cellules endothéliales proliféraient en monocouche à l'image de l'artère native, et en plus grand nombre sur les structures nanofibreuses après 15 jours de prolifération [159]. La comparaison entre les Figures 25.A et 25.C ne montre aucune différence en ce qui concerne la disposition en monocouche des cellules endothéliales (Figure 25).

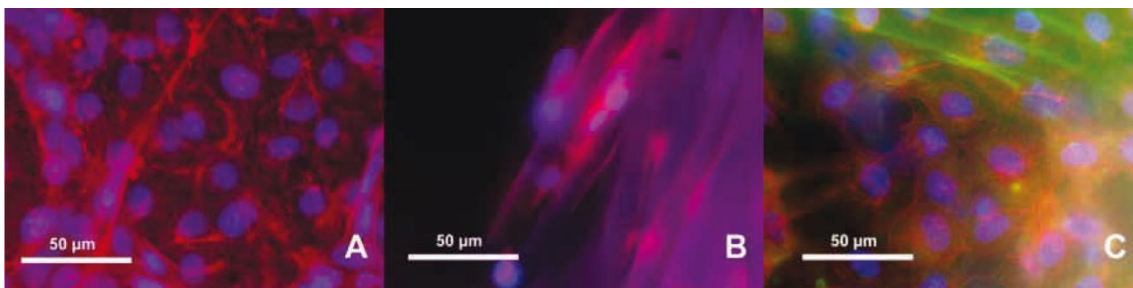


Figure 25. Images en microscopie à fluorescence des cellules endothéliales marquée à la rhodamine/ phalloïdine (filament d'actine) et au DAPI (noyaux des cellules). A : film de PET ; B : Prothèse tissée Cardial ; C : Prothèse tissée recouverte de nanofibres (vert) [159].

8.3 Adhésion des nanofibres sur les structures textiles des prothèses en PET

Afin de résister aux forces de cisaillement appliquées sur la couche de nanofibres, il est nécessaire d'améliorer l'adhésion entre les nanofibres sur les structures textiles. Pour ce faire, des traitements plasma à l'air et à l'azote (N_2) ont été effectués sur les prothèses afin d'activer la surface en diminuant la tension de surface avant de déposer les nanofibres et ainsi crée des liaisons faibles entre des nanofibres hydrophobes et des structures textiles hydrophiles. Les échantillons ont ensuite été testés par test d'arrachement. Les résultats de cette étude ont démontré que les traitements par plasma N_2 permettaient une meilleure adhérence des nanofibres sur la surface de la prothèse tout en empêchant la dégradation de la prothèse pendant le traitement de surface contrairement aux traitements à l'air [160].

L'étude en question [160] fait également la preuve de concept que la technique du filage par jet d'air permet le recouvrement des prothèses vasculaires sous forme tubulaire par des nanofibres par la conception d'un nouvel appareillage qui maintient la prothèse.

9. Résumé

Ce premier chapitre introduit l'environnement du projet de thèse par une revue de la littérature sur les vaisseaux sanguins, l'endothélium, les maladies vasculaires, les substituts vasculaires, les causes d'échecs d'implantation et les stratégies d'amélioration des

substituts vasculaires. De cette revue de la littérature de la problématique générale, il est possible de tirer plusieurs conclusions :

- L'hémodynamique est intimement liée à la structure des artères, notamment aux concentrations de collagène et d'élastine. Plus l'artère est située loin du cœur, moins les propriétés d'élasticité sont importantes.
- Les cellules endothéliales jouent un rôle fondamental dans les fonctions vasculaires et conservent l'intégrité du vaisseau sanguin. Elles constituent la seule surface qui ne provoque pas de réaction inflammatoire en contact avec le sang.
- Dans les cas les plus sévères de maladies vasculaires, les chirurgiens n'ont pas le choix d'implanter par chirurgie ouverte une prothèse vasculaire en Dacron® ou en Téflon®.
- Les prothèses vasculaires sont relativement stables mécaniquement sur de longues périodes, mais restent thrombogènes. Dès son implantation, le biomatériau entre en contact avec le sang, déclenchant ainsi l'activation de l'inflammation et des facteurs de coagulation. De plus, les disparités à l'anastomose entre le vaisseau sanguin natif et le substitut provoquent l'hyperplasie intimale. De par ces observations médicales, il n'existe pas de substitut de faible diamètre viable à long terme.
- La néoendothélialisation *in vivo* de la prothèse est limitée chez l'humain. Néanmoins, les mécanismes de néoendothélialisation transmurale ou par îlots constituent des pistes de recherche potentiellement viables pour une endothélialisation de la prothèse *in situ*.
- La modification de surface pourrait permettre d'améliorer la néo-endothélialisation *in situ* par le greffage de protéine ou de molécules d'intérêt à la surface.
- Les stratégies d'ingénierie tissulaire sont également une voie prometteuse pour la création d'une prothèse endothélialisée *in vitro*.
- La pré-endothélialisation *in vitro* des prothèses vasculaires est un concept d'ingénierie tissulaire prometteur qui a déjà montré de bons résultats par le passé. Cependant, la pré-endothélialisation des prothèses vasculaires nécessite une

interface entre les cellules et la prothèse pour permettre la pérennité de cette solution.

- Une interface de nanofibres produite par filage par jet d'air permet une meilleure adhésion que sur les prothèses vasculaire et une prolifération en monocouche des cellules endothéliales.
- Le traitement par plasma d'azote des prothèses vasculaires améliore l'adhésion des nanofibres sur ces substrats sans les dégrader. Cette preuve de concept a été démontrée mais nécessite une optimisation.

Chapitre II. Projet doctoral

Le projet doctoral présenté dans cette thèse s'inscrit dans la continuité de l'amélioration des prothèses vasculaires textiles en utilisant les concepts de l'ingénierie tissulaire. La stratégie développée conjointement par le Laboratoire d'Ingénierie de Surface (LIS) de l'Université Laval et du Laboratoire de Physique et Mécanique Textile (LPMT) de l'Université de Haute Alsace a pour but d'améliorer l'endothélialisation des prothèses vasculaires afin de concevoir des substituts hémocompatibles avec les concepts évoqués à la section I.9.

Les études précédentes ont permis de montrer qu'un échafaudage de nanofibres permettait la prolifération des cellules endothéliales en monocouche et améliorerait ainsi, considérablement l'endothélialisation des prothèses vasculaires textiles. Cependant, les essais d'endothélialisation ont été effectués sur une période courte de 15 jours dans un environnement statique. On peut donc se demander comment se comportent les cellules endothéliales et les recouvrements de nanofibres sur une plus longue période. Les nanofibres sont, à priori, instable chimiquement et mécaniquement. D'une part, les nanofibres d'acide polylactique, matériau dégradable, s'hydrolysent dans le corps de manière non contrôlable. Les interactions entre les nanofibres, les produits de dégradation et les cellules sont également peu connues. D'autre part, les nanofibres peuvent se délaminer sous les contraintes de cisaillement du flux sanguin. Dans ce contexte, un contrôle de la dégradation des nanofibres permettrait de tirer avantage de cette instabilité et de proposer une solution durable de l'endothélialisation des prothèses vasculaires.

Un état de l'art des domaines de recherche spécifiques à cette thèse est nécessaire pour pouvoir établir une stratégie de travail pour ce projet doctoral. Les prochaines parties sont constituées d'une courte revue de la littérature sur l'évaluation des systèmes de nanofilages, les matériaux biodégradables et l'acide polylactique, domaines spécifiques centraux à cette thèse, mais aussi très dynamiques dans le domaine des biomatériaux.

Finalement, les hypothèses, les problématiques, les objectifs et la stratégie de travail de la thèse sont exposés à la fin de ce chapitre.

1. Production de nanofibres par filage par jet d'air

Les échafaudages de nanofibres sont des structures de prédilection pour l'ingénierie tissulaire car les nanofibres sont des objets de la même taille que les éléments de support de la matrice extracellulaire formant une membrane semi-perméable.

La plupart des recherches menées dans le domaine des nanofibres évoquent la technique du filage électrostatique [161]. Ce système permet l'étirage d'une solution polymérique par force électrostatique entre une aiguille et un collecteur. Ce type d'appareil, très couramment utilisé, permet de fabriquer des nanofibres branchées, poreuses ou tubulaires en utilisant diverses classes de matériaux. Dépendamment de la conception des collecteurs et des appareillages, il est possible de fabriquer des échafaudages complexes comme des structures alignées ou tubulaires. Cependant, le recouvrement de la surface interne de tubes comme des prothèses artérielles est difficilement possible, car l'espace réduit entre la surface de la prothèse et l'aiguille ne permet pas le développement du champ électrique et donc la production de nanofibres [159]. En effet, le développement d'un jet nécessite une certaine distance (typiquement 100mm). Une technique possible est le filage électrostatique à champs proche [162], qui permet de réduire cette distance en utilisant un filament de tungstène à la place de l'aiguille. Cependant, il faudrait pouvoir entraîner le filage au travers de la prothèse qui malgré sa porosité, peut jouer le rôle d'isolant. Ces limites rendent l'utilisation de l'électrospinning difficile. Ces inconvénients du filage électrostatique ont donc motivé la création d'un appareillage de filage par jet d'air.

L'appareillage de filage par jet d'air, présenté dans les travaux précédents [159,160], fonctionne suivant le principe de l'étirement d'un polymère en solution par un flux d'air à haute vitesse et l'évaporation de son solvant. Le polymère dissout dans un solvant est injecté dans une grande aiguille (ou injecteur) au moyen d'un pousse-seringue à débit contrôlé. En parallèle, un flux d'air à haute vitesse est produit par un atomiseur dont la pression est contrôlée en entrée, et étire le polymère en sortie de filière. La distance entre l'aiguille de sortie et le substrat permet d'évaporer le solvant dans l'air. Un élément supplémentaire a ensuite été conçu pour permettre la mise en place d'un tube textile.

La qualité et les propriétés du recouvrement ainsi que sa dégradation sont contrôlées en partie par les paramètres de filage et de la solution de départ. Ces paramètres sont les suivants :

- **Vitesse de sortie de l'air** : Elle dépend de la pression d'entrée, de la géométrie de la buse et de son diamètre, ainsi que du diamètre de l'aiguille. La pression de sortie est la force qui permet de former les fibres. Par analogie, on peut la comparer à la force coulombienne qui permet d'étirer les fibres en filage électrostatique. Zhang *et al.* [163] ont montré qu'une augmentation de cette force diminue la distribution en diamètre des fibres. Cependant, en couplant d'autres paramètres, il est possible de réduire le diamètre des fibres. En filage par jet d'air, François *et al.* [159] ont montré qu'une augmentation de la pression d'air induit des ruptures des fibres lors du filage.
- **Tension de surface de la solution** : Elle est majoritairement liée au solvant utilisé et permet la formation et la stabilité de la goutte à étirer. Une tension de surface élevée augmente la formation de « perle » dans le non-tissé de nanofibres [164].
- **Viscosité de la solution** : Elle dépend principalement du solvant, de la concentration et de la taille de la molécule (M_n , M_w). L'augmentation de la concentration montre une augmentation du diamètre des fibres. Cependant, ces observations dépendent de la capacité de l'appareillage à produire des fibres selon des paramètres d'entrée maîtrisés. En effet, plus la viscosité est grande, plus le taux de fibre est grand [164].
- **Débit fourni par le pousse-seringue** : Le débit compense la tension de surface couplée à la pression d'entrée. Un débit trop grand avec une pression trop faible implique la création de structure poreuse.
- **Diamètre de l'aiguille de sortie** : Ce paramètre joue un rôle sur la capacité de filage ainsi que sur le diamètre des fibres.
- **Distance entre l'aiguille et le substrat** : Une distance suffisante permet l'évaporation du solvant.

- **Environnement** : Des études ont montré que l'augmentation de la température diminuait légèrement le diamètre des fibres tandis que l'augmentation de l'humidité augmentait la taille des pores.

La plupart de ces effets sont rapportés par analogie avec le filage électrostatique [161].

2. Dégradation des biomatériaux

2.1 Généralités

De manière générale, le vieillissement des matériaux est un changement thermodynamiquement irréversible de la structure et des propriétés des matériaux sous l'effet de son instabilité propre, de son interaction avec l'environnement, de sollicitations mécaniques ou de la synergie entre ces effets. Dans le vieillissement, on trouve la notion de cycle de vie. En effet, les matériaux sont créés et formés pour être appliqués à une ou plusieurs fonctions puis, suivant un temps donné, ils se dégraderont et ne pourront plus satisfaire les contraintes de cette fonction. Dans la plupart des cas de conception de matériaux à des fins industrielles, on cherche la stabilité et la durabilité ; le matériau ne doit en aucun cas se rompre ou perdre ses propriétés pendant un temps adapté. Parfois, le temps d'utilisation est contrôlé et les pièces usées sont changées suivant un schéma prévisionnel.

A l'échelle de la molécule, plusieurs types de liaisons chimiques ou groupes chimiques fonctionnels sont connus pour se rompre sous un environnement particulier. On appelle ce phénomène la dégradation. La dégradation se rapporte donc à la notion de perte de propriétés physique, contrôlée ou non. L'hydrolyse est un type de dégradation majeure dans le domaine des polymères dégradables. Cette réaction est applicable à un grand nombre de polymères en présence d'eau et de facteurs cinétiques. Notamment, l'hydrolyse des esters (Figure 26) ou des amides est très connue dans le domaine des biomatériaux. En effet, un grand nombre de polyesters ou polyamides peuvent se dégrader par ce mécanisme en milieu physiologique. Cette réaction du polymère avec l'eau donne un alcool ou une amine et un acide carboxylique. En milieu physiologique, l'hydrolyse est catalysée par des enzymes. Elle est présente dans la métabolisation des protéines chez tous les êtres vivants.

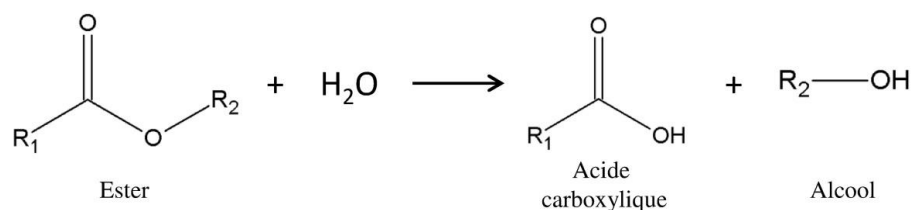


Figure 26. Hydrolyse d'un ester

On peut citer également la photolyse [165] ou la radiolyse [166], réactions de coupures de chaîne macromoléculaire par des photons ou des rayonnements ionisants. Certains polymères se dégradent également sous atmosphère d'ozone comme les alcènes [167] ou simplement en présence d'oxygène, élément qui peut induire une catalyse de la réaction de dégradation.

Dans notre cas, la dégradation fait partie intégrante des propriétés et des fonctions dans la conception du matériau. Par conséquent, les biomatériaux dégradables implantables chez l'humain doivent obéir à un cahier des charges strict :

- Comme tous les biomatériaux, ils ne doivent pas provoquer de réponses immunitaires inappropriées dès leur implantation et jusqu'à la fin de leur vie.
- Ils doivent présenter un temps de dégradation correspondant au temps de leur fonction.
- Leurs propriétés mécaniques doivent être adaptées à leur utilisation.
- Ils ne doivent pas créer de produits de dégradation toxiques pendant tout le temps de leur dégradation.
- Leurs propriétés physiques doivent pouvoir facilement être ajustées et de façon contrôlée [168].

2.2 Mécanismes et contrôle de la biodégradation des polymères

Dans la section précédente, nous avons évoqué plusieurs types de dégradation comme la bioérosion ou la fatigue des matériaux. Dans cette partie nous allons détailler certains de ces mécanismes.

2.2.1 Mécanisme de bioérosion hydrolytique

La bioérosion est un mécanisme qui dépend grandement de la forme de l'implant et de sa structure physique. Dans le domaine de la dégradation des polymères, on distingue deux types d'érosion : l'érosion en surface (Figure 27a) et l'érosion volumique (Figure 27b) [169,170]. Comme leur nom l'indique, ces deux catégories décrivent le mécanisme selon lequel se dégrade le matériau. Certaines molécules vont laisser passer l'eau entre leurs chaînes, ce qui implique une diffusion homogène des molécules d'eau à travers l'échantillon. Si cette diffusion est plus rapide que la coupure des chaînes, il survient alors une dégradation volumique du matériau. Au contraire, si les chaînes se brisent avant que l'eau ne diffuse dans le matériau, l'échantillon va tendre à se dégrader en surface.

Ces mécanismes dépendent également de la taille de l'objet. Ce modèle descriptif de cinétique de diffusion implique un changement de mécanisme dans le processus de dégradation lorsque le matériau se sera érodé en dessous d'une épaisseur critique. Le diagramme de la Figure 4.e montre les valeurs des épaisseurs critiques pour certains matériaux [169,171]. Au-dessus de cette épaisseur le matériau se dégrade de manière surfacique. Sous cette valeur, il se dégrade de façon volumique. On remarque que ces épaisseurs dépendent également de la cinétique de dégradation propre de ces polymères. Un matériau se dégradant très rapidement, comme les polyanhydrides, privilégie un mécanisme surfacique tandis que les polyamides se dégraderont surtout de façon volumique.

2.2.2 Dégradation enzymatique

Les enzymes sont des protéines fabriquées par les cellules servant à catalyser les réactions biochimiques. La présence d'enzymes va ainsi permettre de diminuer l'énergie d'activation des réactions d'hydrolyse et donc agir en tant que catalyseur de la réaction hydrolytique du matériau. Ces enzymes sont spécifiques aux liaisons. Par exemple, l'estérase favorise le clivage des liaisons esters pour les transformer en alcool et acide carboxylique. La présence de lipase entraîne la coupure d'un ester triglycérique en acide gras.

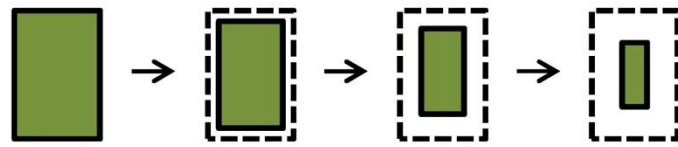
Cependant, ces enzymes extrêmement spécifiques, ne réagissent pas de la même manière avec des matériaux différents portant les mêmes liaisons. Le PCL est sensible à la lipase ce qui n'est pas le cas pour le PLA. De plus, ces deux esters ne sont pas sensibles aux estérases [172]. L'accessibilité du matériau aux enzymes peut expliquer ces différences notamment à cause des propriétés de surface. En effet, l'hydrophilicité va permettre le passage des enzymes au cœur du matériau. Si ce n'est pas le cas, la dégradation enzymatique sera observée en surface du matériau [170].

La dégradation enzymatique fonctionne exactement comme le mécanisme d'hydrolyse vu précédemment. Dans certains cas, les enzymes sont trop grosses pour passer entre les chaînes de polymère, contrairement aux molécules d'eau, ce qui engendre une hydrolyse simple par bioérosion volumique au cœur du matériau et une hydrolyse enzymatique catalysée en surface du matériau. À l'image de l'eau pour la bioérosion générale, si la diffusion de l'enzyme est plus rapide que le clivage des liaisons spécifiques à l'enzyme, la bioérosion passera d'un mode enzymatique à un mode global. De ce fait, la présence d'enzyme permet de créer un troisième mode de bioérosion modélisé par un couplage entre une dégradation enzymatique et surfacique et une dégradation hydrolytique et volumique (Figure 27d) [170].

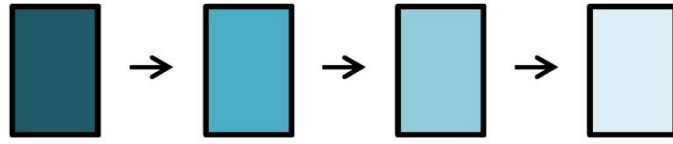
2.2.3 Mécanismes moléculaires et autocatalyse

La dégradation des polymères est un processus très dynamique. A l'échelle moléculaire, les chaînes de polymères se brisent de façon aléatoire pour ainsi former des chaînes de plus en plus petites et nombreuses. Ce mécanisme conduit au désassemblage des chaînes en oligomères solubles dans l'eau ; on observera donc une diminution de la masse moléculaire tout au long du processus. Cette évolution dépend également de l'organisation du polymère dans l'espace, de sa cristallinité et de sa capacité à former des liaisons faibles avec les chaînes voisines. Ces propriétés physico-chimiques ne doivent pas être négligées pour comprendre les mécanismes de dégradation [173].

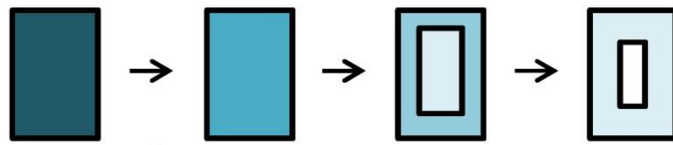
On verra également apparaître une autocatalyse complexe du polymère face à sa propre dégradation. La dégradation du matériau peut engendrer un changement de sa cristallinité, de son hydrophobicité, de sa morphologie, de la relaxation de ses chaînes, du pH de son environnement local qui peuvent conduire à une accélération de sa dégradation ou un changement de mode de dégradation [173]. De plus, dans le cas d'un mode d'érosion volumique de matériaux peu poreux, les produits de dégradation piégés au cœur du matériau auront tendance à catalyser sa dégradation et produire un mode de dégradation volumique non homogène jusqu'à libération des produits de dégradation (Figure 27c) [174].



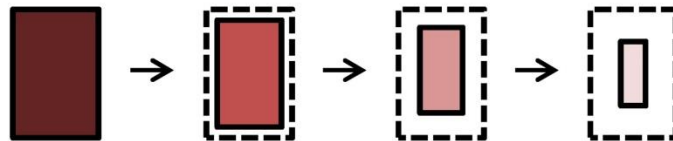
a. Érosion surfacique



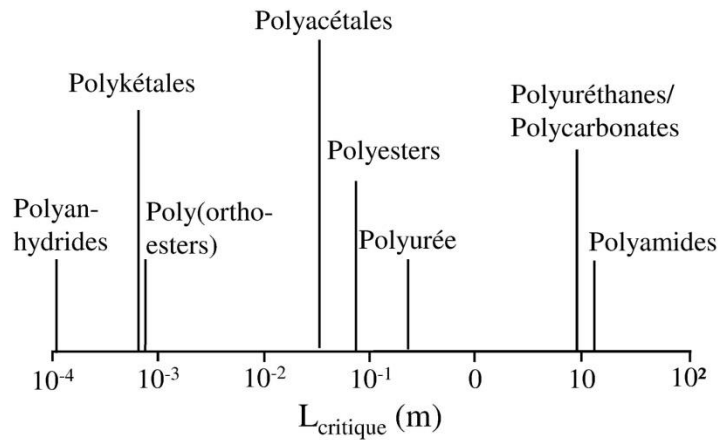
b. Érosion volumique



c. Érosion volumique autocatalysé



d. Érosion enzymatique



e. Épaisseur critique

Figure 27. Mécanismes de bioérosion des matériaux. **a.** Érosion surfacique, **b.** Érosion volumique, **c.** Érosion volumique autocatalysée, **d.** Érosion enzymatique, **e.** Épaisseur critique (adaptée de [169–171,175])

2.2.4 Cinétique de réaction

A partir des deux modes d'érosion (surfactive ou volumique) principaux, on peut modéliser l'hydrolyse des polymères sur les bases de la cinétique chimique classique [170]. La dégradation surfactive est caractérisée par une perte de masse du polymère. Les produits de dégradation, labiles, vont soit former une suspension colloïdale avec le milieu aqueux puis se dégrader à leur tour, soit directement se solubiliser. Ce système peut donc être représenté par une réaction cinétique d'ordre 0. L'Équation suivante décrit l'évolution de la masse en fonction du temps dans un mode de dégradation surfactive (Équation 4) :

$$\frac{dm}{dt} = -k \Leftrightarrow m(t) = m_0 - kt \quad (\text{Eq. 4})$$

où m est la masse du polymère (en g), m_0 la masse initiale (en g), k (en s^{-1}) une constante de cinétique dépendant du matériau et de ses propriétés.

Cette Équation peut être transposée en fonction des conditions géométriques. Dépendant du système étudié, la masse peut être remplacée par l'épaisseur pour un film ou par la variation de diamètre pour une particule circulaire ou une fibre.

Dans le cas d'une dégradation volumique du matériau, les produits de dégradation sont enfermés à l'intérieur de celui-ci. Ce phénomène, principalement étudié chez les polyesters aliphatiques, peut créer une accélération de la dégradation par autocatalyse au cœur du matériau. A l'opposé de la dégradation en surface, la masse reste donc constante, avec cependant, une diminution de la masse moléculaire. Ce modèle peut être simulé par une cinétique d'ordre 1. L'Équation suivante décrit l'évolution de la masse moléculaire en fonction du temps dans un mode de dégradation volumique (Équation 5) :

$$\frac{dM_n}{dt} = -k \cdot M_n(t) \Leftrightarrow M_n(t) = M_0 e^{-kt} \quad (\text{Eq. 5})$$

où M_n est la masse moléculaire en nombre (en g/mol), M_0 est la masse moléculaire initiale en nombre (en g/mol), k une constante de cinétique en s^{-1} dépendant du matériau et de ses

propriétés. Dans certaines études, la masse moléculaire en nombre peut être substituée à la masse moléculaire en poids. Cependant, la constante k sera différente et prendra en compte l'indice de polydispersité. Cette Équation est valable si le polymère forme un solide cohérent. Dans les derniers stades de la dégradation et à très faible valeur de M_n , le matériau sera formé uniquement d'oligomères en solution dans le milieu de dégradation. Dans ce cas, c'est la viscosité qui sera le paramètre le plus à même de décrire la dégradation des petites chaînes de polymère. On préférera utiliser l'Équation de Mark-Houwink (Équation 6) dans l'Équation 5 pour modéliser la dégradation des polymères (Équation 7).

$$[\eta] = KM_n^\alpha \quad (\text{Eq. 6})$$

$$[\eta] = [\eta]_0 e^{-\alpha kt} \quad (\text{Eq. 7})$$

où $[\eta]$ est la viscosité intrinsèque, $[\eta]_0$ la viscosité intrinsèque initiale, α et K les constantes de Mark-Houwink dépendant du polymère.

La dégradation enzymatique a également été modélisée mais elle ne fera pas l'objet d'une discussion dans cette thèse.

3. Caractérisation et dégradation de l'acide polylactique

En 1845, le PLA a été pour la première fois synthétisé par Théophile Jules Pelouze par la condensation de l'acide lactique. En 1932, Wallace Hume Carothers a ensuite polymérisé le PLA par ouverture du cycle de lactide afin de produire un PLA à haut poids moléculaire. Ce procédé a finalement été breveté par la société DuPont en 1954. En 1971, le PLA est pour la première fois mis sur le marché sous forme de fil de suture. Dans les années 70, ce matériau se produisait à coût élevé et en petite quantité, ce qui pouvait convenir pour le faible volume requis pour les applications biomédicales. Ce n'est que dans les années 90 que le PLA intéresse vraiment les industriels dans le but de remplacer les polymères issus des ressources fossiles par des matériaux renouvelables. Cet intérêt grandissant pour le PLA a considérablement réduit son coût. Le PLA est, aujourd'hui, un matériau très en

vogue dans le secteur des polymères pour l'environnement, l'agroalimentaire, mais aussi dans l'industrie biomédicale et paramédicale [176,177]. Aujourd'hui, son coût est néanmoins plus élevé que celui du polyéthylène ou du polypropylène.

3.1 Synthèse d'acide polylactique

La polymérisation par condensation par déshydratation azéotropique ainsi que la polymérisation enzymatique ou les méthodes de polymérisation directe de l'acide lactique (Figure 28) sont généralement peu utilisées dans l'industrie car elles permettent de produire uniquement des PLAs de faibles poids moléculaires. Cette limite est due à l'hydrolyse du polymère pendant sa polymérisation. Ces méthodes ne seront pas décrites ici.

La polymérisation par ouverture de cycle est la plus utilisée et passe par un pré-polymère appelé acide lactoyl-lactique, oligomère de l'acide lactique [178,179]. Ce pré-polymère permet également de former le cycle de lactide par dimérisation de l'oligo(acide lactique) et estérification intramoléculaire. Le lactide est ensuite purifié par distillation ou par cristallisation. La polymérisation du PLA peut ensuite se faire par ouverture du cycle de lactide. La qualité de la polymérisation dépend également de l'initiateur et du catalyseur. L'ouverture du cycle de lactide peut s'initialiser par un groupement OH, privilégiant ainsi l'utilisation de l'eau ou d'un alcool. L'eau permet de polymériser le PLA de façon classique tandis que l'alcool peut conduire à la formation de copolymère par blocs. Par exemple, la copolymérisation du PEG avec le PLA a été longuement étudiée [180]. L'octoate de zinc ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$) est le catalyseur le plus utilisé dans la polymérisation du PLA. Il est activé en début de polymérisation par les groupements OH. D'autres métaux de transition ont été utilisés dans la réaction comme le titane, le zinc, le fer ou l'aluminium [178]. Ces différents catalyseurs conduisent à des propriétés de dégradation différentes.

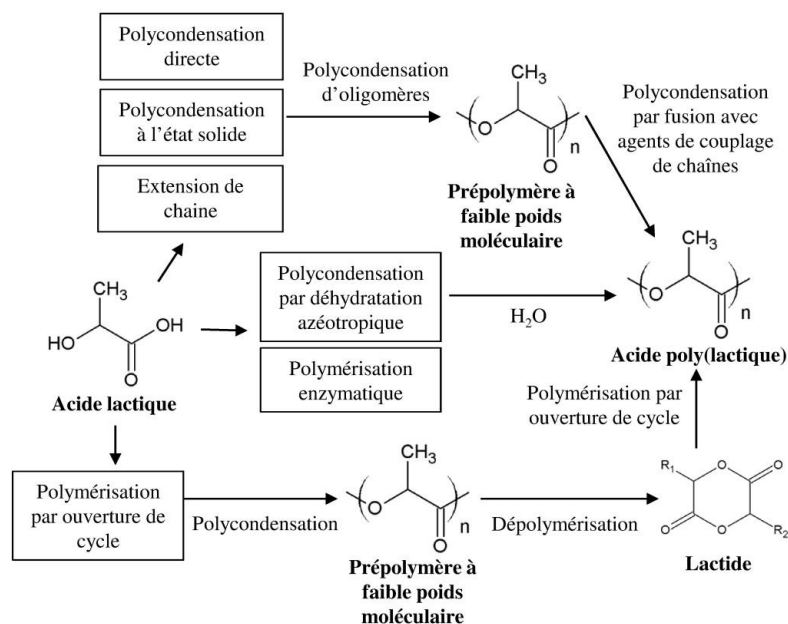


Figure 28. Différentes voix de polymérisation de l'acide polylactique (adaptée de [179])

3.2 Conception de différents PLAs

L'acide lactique est présent dans la nature sous la forme de dimère. Deux formes énantiomères sont possibles dépendant de la position du groupement CH_3 par rapport à l'hydrogène H (Figure 29). Ces deux formes sont communément appelés LLA (L pour lévogyre) et DLA (D pour dextrogyre). Le lactide, étant un dimère cyclique, présente trois formes stéréoisomériques appelées L-lactide, D-lactide et méso-lactide ou DL-lactide (Figure 30). Ces trois formes vont donc donner plusieurs PLAs distincts avec des propriétés différentes dépendamment des conditions de polymérisation. Néanmoins, on utilise généralement soit un mélange dit racémique (L-lactide et D-lactide), soit mésomérique (D,L-lactide), soit aléatoire. Le PLA est souvent représenté, en couple de monomère, par diades (bloc de deux monomères), tétrades (blocs de 4 monomères) ou hexades (blocs de 8 monomères), dû à la configuration dimérique du lactide [181]. De plus, chaque forme du PLA (PLLA, PDLA et PDLLA) peut être vue comme trois polymères différents. Du point de vue de la polymérisation, les isomères de lactide peuvent se polymériser entre eux sous

forme de mélange racémique, mésomérique ou se co-polymériser par blocs pour obtenir *in fine* des structures plus complexes.

3.3 Dégradation du PLA

L'hydrolyse du PLA, d'un point de vue réactionnel, est extrêmement simple. Le PLA est un polyester possédant un groupement alcool d'un côté de sa chaîne et un groupement acide carboxylique de l'autre côté. L'eau a donc pour effet d'attaquer la liaison ester ce qui donne deux chaînes de PLA de masse moléculaire plus petite.

La taille des dispositifs utilisés dans le domaine des biomatériaux impose aux PLAs de se dégrader suivant un mécanisme de dégradation volumique [171]. D'après ce qui a été écrit précédemment, la dégradation du PLA sera donc contrôlée par l'évolution de sa masse moléculaire. Ce contrôle obéit aux lois d'une cinétique de premier ordre. Dans ce contexte, le temps de demi-vie du polymère, temps caractéristique de la réaction, obéit à la loi suivante (Équation 8):

$$\tau = \frac{\ln 2}{k} \quad (\text{Eq. 8})$$

où k est la constante de cinétique décrite précédemment (en s^{-1}).

A partir de cette formule et de mesures en GPC, il est possible de caractériser le taux de dégradation des PLAs. Par exemple, Saha et al [182] ont démontré que les propriétés de dégradation varient fortement lors d'un ajout d'une faible quantité d'isomère D dans le PLLA, montrant ainsi l'importance des résidus de D-lactide dans le PLLA. Cette équipe a trouvé des temps de demi-vie de 1600 jours pour le PLLA, de 870 jours lorsqu'on ajoute 0,2 % de DLA et 490 jours pour un ajout de 1,2 % de DLA dans le PLLA. Alexis et al [183] ont identifié un temps de demi-vie de 80 jours pour le PDLLA. De plus, Zhang et al [184] ont étudié l'influence des paramètres de polymérisation (température, pourcentage de catalyseur, temps) sur la dégradation du PLLA et du PDLLA [185].

Au niveau microstructural, la dégradation s'effectue en deux phases. Les phases amorphes du PLA se dégradent de manière privilégiée par rapport aux phases cristallines. Cela aura pour effet d'augmenter le taux de cristallinité du polymère. Tsuji et al [186] ont montré que le taux de cristallinité d'un film de PLLA dégradé pendant 36 mois dans du PBS pouvait passer de 54% à 78%. De plus, cette même étude montre qu'un PLA initialement amorphe peut cristalliser durant la dégradation. Les phases amorphes se dégradant, le matériau devient donc de plus en plus dur et fragile ce qui se traduit par une augmentation du module d'élasticité et de la résistance à la traction. Ces propriétés deviennent ensuite nulles par la perte d'intégrité physique du polymère par la solubilisation de ses chaînes. Les phases cristallines du PLA sont extrêmement stables par comparaison aux phases amorphes. Joziasse et al [187] ont estimé que les cristaux de PLA pouvaient se dégrader pendant 40 à 50 ans dans des conditions *in vivo* avant d'être solubilisés. Cette dégradation longue est susceptible d'entraîner une grande diminution du pH local lors du relargage des produits acides dans le milieu car la dégradation des phases cristallines limite fortement la diffusion de l'eau à travers le matériau [188].

On peut donc distinguer trois phases dans le mécanisme de dégradation du PLA [189] :

- Les phases amorphes se dégradent progressivement en se détachant des phases cristallines et se dégradent au cœur du polymère.
- Les phases amorphes se solubilisent. Le polymère perd son intégrité.
- Les phases cristallines se dégradent pendant un temps très long.

Globalement, l'ajout d'isomère D dans le PLLA ou réciproquement d'isomère L dans le PDLA augmente considérablement l'hydrolyse à cause d'une diminution brutale du taux de cristallinité [171]. Karst et al [190,191] avance une autre explication : l'ajout d'isomère D dans le PLLA diminue l'énergie potentielle d'activation de l'hydrolyse. Une autre étude de simulation moléculaire faite par le même groupe montre que l'arrangement des isomères L et D a un effet important sur l'hydrolyse.

Le choix du PLA dans cette thèse s'est fait évidemment à cause de sa présence abondante dans le domaine des matériaux en médecine. Néanmoins, nous verrons au fur et mesure de la thèse que ce matériau, grandement utilisé et prometteur dans beaucoup de domaines, présente également des faiblesses pour notre application très spécifique. Par ailleurs, il se présente comme un excellent modèle pour les études des mécanismes de dégradation. Le premier mécanisme, macroscopique, est la bioérosion, caractérisée, dans le cas du PLA, par la perte de masse moléculaire. Le deuxième mécanisme est microstructural et concerne la cristallinité des produits synthétisés. Le troisième, moins étudié, est moléculaire et encore trop marginalisée dans la littérature. En effet, l'influence de la position des isomères dans la chaîne est à l'origine des caractéristiques cristallines. Enfin, aucune description dans la littérature n'intègre toutes ces notions.

4. Hypothèses, objectifs et stratégie de travail de la thèse

4.1 Postulat sur le contrôle de la dégradation

Les études précédentes ont montré qu'un échaffaudage de nanofibres de PLA permet la croissance en monocouche des cellules endothéliales. Cependant, la dégradation chimique et la délamination des nanofibres dans un environnement physiologique de manière non-contrôlée peuvent représenter un frein à l'endothélialisation et la réussite à long terme de l'implantation de tels dispositifs. En effet, si le matériau se dégrade avec la formation de l'endothélium, la croissance des cellules se fera à l'intérieur de la prothèse. Au contraire, si la dégradation est trop longue, les fibres se délamineront à cause des contraintes de cisaillement produites par le flux sanguin. La problématique générale de cette thèse est de tirer avantage de ces instabilités en contrôlant la dégradation des nanofibres.

Le contrôle de cette dégradation présente certains avantages :

- Dans le cadre de cette thèse, la fonctionnalité première de l'échafaudage est de supporter la croissance tissulaire. Par conséquent, après la régénération totale du tissu, l'échafaudage a rempli son rôle et n'a plus d'utilité [168]. Il doit donc se dégrader de manière contrôlée, adéquate, sans effet délétaire et être naturellement

remplacé par la matrice extracellulaire des cellules. Cette fonction présente également l'avantage d'obtenir une matrice extracellulaire entièrement produite par les cellules.

- Une dégradation relativement rapide des nanofibres et une augmentation suffisante de l'adhésion des nanofibres permettraient d'éviter la délamination des nanofibres sous flux.
- L'expérience montre que l'implantation de dispositifs médicaux non dégradables occasionne des complications à long terme. On le voit très bien dans la diminution du taux de réussite des prothèses artérielles au cours du temps. En effet, les pathologies, qui apparaissent initialement, mettent un certain temps pour se développer avant de compromettre la vie du patient. De plus, d'autres pathologies, ayant pour cause la stabilité chimique et mécanique de la prothèse, peuvent survenir plusieurs années après l'implantation. Les implants dégradables peuvent constituer une excellente alternative aux dispositifs temporaires et permettraient de réduire les réactions inflammatoires et l'apparition de certaines pathologies postopératoires [192].
- La fonction de dégradation contrôlée des polymères est très souvent utilisée dans le domaine pharmaceutique pour le relargage de médicament à partir, par exemple, de particules contenant le médicament à l'intérieur ou sur sa surface. L'utilisation d'échafaudage dégradables, contrairement à permanents, est donc très polyvalente et permet la fonctionnalisation des dispositifs afin de remplacer temporairement certaines fonctions cellulaires, empêcher des événements biologiques ou soigner des maladies. L'utilisation d'un échafaudage de nanofibres dégradables offre donc l'opportunité de l'utiliser comme système de relargage de médicament.

4.2 Objectifs de la thèse

L'objectif général de la thèse est donc de concevoir et d'élaborer un échafaudage de nanofibres dont la dégradation est contrôlée et qui pourrait être utilisé en médecine régénératrice vasculaire.

Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse sont les suivants.

- Mieux comprendre les mécanismes de dégradation des nanofibres d'acide polylactique (PLA) afin de déterminer le potentiel de ce matériau à être utilisé pour des applications vasculaires en termes de dégradation.
- Optimiser le paramétrage du système de filage et comprendre les mécanismes physiques de la formation des fibres dans le but de fabriquer des nanofibres d'autres polymères mieux adaptées à nos besoins.
- Analyser les besoins de conception d'un nouveau matériau sous forme d'échafaudage de nanofibres pour des applications vasculaires qui pourrait être fabriqué de manière optimisée.
- Établir de nouveaux outils et protocoles afin de mieux comprendre les mécanismes de dégradation des nanofibres de matériaux dégradables.
- Comprendre les mécanismes de dégradation des nanofibres de ce nouveau matériau et les interactions entre les cellules endothéliales et le matériau pendant son cycle de vie. Évaluer les bénéfices de la conception d'un nouveau matériau pour le recouvrement des prothèses vasculaires et établir des stratégies d'optimisation.
- Identifier des stratégies de fonctionnalisation des nanofibres dans le but d'améliorer l'hémocompatibilité des nanofibres à base de PLA et des méthodes de relargage de composés d'intérêt.
- Améliorer l'adhésion des nanofibres sur la surface textile des prothèses vasculaires en PET en optimisant les traitements par plasma déjà réalisés.

4.3 Stratégie de travail

La thèse présentée comporte trois chapitres définissant le corps du document et cinq annexes constituant des travaux supplémentaires en lien avec ces chapitres.

Deux PLAs commerciaux, dont l'un utilisé dans les travaux précédents, seront filés et testés pendant 90 jours dans différents milieux. Des essais de spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton (^1H -NMR) simple et par découplage homonucléaire seront

effectués afin de suivre les changements moléculaires de la chaîne linéaire du PLA durant la réaction d'hydrolyse. Ces essais permettront de mieux comprendre les mécanismes de dégradation des nanofibres de PLA. Ces travaux seront présentés dans le chapitre III de cette thèse et ont fait l'objet d'un article publié en 2012 dans *Polymer Degradation and Stability* (G. Sabbatier, D. Le Nouën, P. Chevallier, B. Durand, G. Laroche, F. Dieval, 2012. Air spun poly(lactic acid) nanofiber scaffold degradation for vascular tissue engineering: A ¹H NMR study. *Polym. Degrad. Stab.* 97, 1520–1526.)

Le PLA n'est pas le meilleur polymère pour des applications en ingénierie tissulaire vasculaire. Il peut cependant servir de contrôle pour optimiser le système de filage. Des nanofibres de PLA seront fabriquées suivant un plan d'expérience défini en fonction des paramètres de filage. Une étude statistique de la morphologie des fibres permettra d'optimiser la production des nanofibres et d'éclaircir les relations entre paramètres et phénomènes physiques. Cette compréhension permettra de fabriquer des nanofibres à base d'autres polymères dans des conditions optimisées. Ces travaux seront présentés dans le Chapitre IV de cette thèse et ont fait l'objet d'un article publié en 2014 dans *Material Science and Engineering : Part. C* (G. Sabbatier, P. Abadie, F. Dieval, B. Durand, G. Laroche, 2014. Evaluation of an air spinning process to produce tailored biosynthetic nanofibre scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C* 35, 347–353).

Un nouveau polymère sera conçu, synthétisé et comparé au PLLA utilisé couramment dans les dispositifs médicaux biodégradables. Ces deux polymères seront fabriqués sous forme de films et d'échafaudages de nanofibres dans des conditions optimisées. Ces échantillons seront ensuite dégradés en solution aqueuse tamponnée (PBS) et caractérisés par des méthodes physicochimiques afin de mieux comprendre leurs mécanismes de dégradation, puis, mis en présence de cellules endothéliales pour évaluer leur cytotoxicité en fonction du temps de dégradation. Ces travaux seront présentés dans le Chapitre V de cette thèse et ont fait l'objet d'un article publié en ligne en 2015 dans *Macromolecular Bioscience* (G. Sabbatier, A. Larrañaga, A.-A. Guay-Bégin, J. Fernández, F. Dieval, B. Durand, J.-R. Sarasua, G. Laroche, 2015. Design, Degradation Mechanism and Long-Term Cytotoxicity of Poly(L-lactide) and Poly(Lactide-co-e-Caprolactone)

Terpolymer Film and Air-Spun Nanofiber Scaffold. *Macromol. Biosci.* 15, doi : 10.1002/mabi.201500130).

Une nouvelle stratégie de fonctionnalisation des nanofibres sera étudiée à partir d'une méthode de polymérisation radicalaire par transfert d'atome initiée par la surface des nanofibres (SI-ATRP). Un PLA modèle possédant un groupement terminal avec un groupement disulfure et un atome de brome sera conçu (PLA-SS-Br). Le brome permettra le greffage d'un composé hydrophile (OEOMA) par SI-ATRP. Pour sa part, le pont disulfure servira à relarguer ce composé hydrophile dans un milieu réducteur. Le but de cette étude est de fonctionnaliser des nanofibres dégradables par un composé hydrophile modèle. Ces travaux seront présentés en annexe I et ont fait l'objet d'un article publié en 2014 dans *Macromolecular Rapid Communications* (N.R. Ko, G. Sabbatier, A. Cunningham, G. Laroche, J.K. Oh, 2014. Air-spun PLA nanofibers modified with reductively sheddable hydrophilic surfaces for vascular tissue engineering: Synthesis and surface modification. *Macromol. Rapid Commun.* 35, 447–453).

Les nanofibres ont montré des comportements différents par rapport aux films vis-à-vis de leur dégradation. Dans la continuité des études menées aux chapitre III et V, il est nécessaire de mieux comprendre l'agencement moléculaire des nanofibres avant et pendant la dégradation en établissant de nouveaux outils et protocoles. Des études de calorimétrie différentielle à balayage à modulation stochastique (TOPEM-DSC), la diffraction des rayons X (DRX) et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) sont des techniques non conventionnelles qui ont permis de mieux comprendre d'établir des protocoles de base vers une meilleure compréhension de la dégradation des polymères à base de PLA à plusieurs échelles. Ces travaux seront présentés en annexe II, III et IV et n'ont pas encore été publiés.

L'amélioration de l'adhésion des nanofibres sur les surfaces textiles et son évaluation est une condition nécessaire à l'endothélialisation adéquate des prothèses vasculaires en PET. Une étude précédente a montré qu'un traitement par plasma d'azote à pression atmosphérique améliorerait cette adhésion tout en gardant l'intégrité de la surface de la

prothèse. D'autre part, l'ajout d'hydrogène dans le gaz favoriserait le greffage de groupement amine primaire à la surface du PET créant ainsi des ponts hydrogènes avec l'ester des nanofibres de PLA. Le but de cette étude est donc d'optimiser ce traitement de surface et d'évaluer l'adhésion des nanofibres sur ces surfaces. Ces travaux seront présentés en annexe V et n'ont pas encore été publiés.

Chapitre III. Dégradation d'échafaudage de nanofibres d'acide polylactique filé par jet d'air pour l'ingénierie tissulaire vasculaire : une étude de RMN du proton

Air spun poly(lactic acid) nanofiber scaffold degradation for vascular tissue engineering: a ^1H -NMR study

Gad Sabbatier ^{1, 2, 3}, Didier Le Nouën ⁴, Pascale Chevallier ^{2, 3}, Bernard Durand ¹, Gaétan Laroche ^{2, 3}, Florence Dieval ^{1*}

¹ Laboratoire de Physique et Mécanique Textile, Université de Haute Alsace, École Nationale Supérieure d'Ingénieurs du Sud Alsace, 68093 Mulhouse Cedex, France

² Laboratoire d'Ingénierie de Surface, Centre de Recherche sur les Matériaux Avancés, Département de génie des mines, de la métallurgie et des matériaux, Université Laval, Québec (QC), G1V 0A6, Canada

³ Centre de recherche du CHU de Québec, Hôpital St François d'Assise, Québec (QC), G1L 3L5, Canada

⁴ Laboratoire de Chimie Organique et Bio-organique, Université de Haute Alsace, École Nationale Supérieure de Chimie de Mulhouse, 68200 Mulhouse cedex, France

Published in Polymer Degradation and Stability

August 2012

*Corresponding Author : Florence Dieval, Université de Haute Alsace, Ecole Nationale Supérieure d'Ingénieurs du Sud Alsace, 11 rue Alfred Werner 68093 Mulhouse, France. E-mail: florence.dieval@uha.fr.

1. Résumé

Nos études précédentes ont démontré que le recouvrement d'un réseau de nanofibres d'acide poly (lactique) (PLA) filées par jet d'air pouvait être utilisé pour promouvoir la croissance des cellules endothéliales en monocouche sur les prothèses vasculaires en poly (éthylène terephthalate). Le PLA est un des matériaux principaux pour cette application parce qu'il se dégrade lentement, et pourrait être ensuite remplacé graduellement par les composants de la matrice extra-cellulaire. Les paramètres clés pour un remplacement réussi sont, d'une part le mécanisme de dégradation et d'autre part, le taux d'hydrolyse du PLA. Par conséquent, dans cette étude, la progression de la dégradation du PLA a été analysée en utilisant la spectroscopie RMN du proton. Contrairement aux analyses classiques basées sur les changements de cristallinité (DSC, XRD) ou sur la perte de la masse moléculaire, la spectroscopie RMN permet de tester le polymère au niveau moléculaire. De ce fait, l'analyse des pics de RMN assignés aux fins de chaînes peut être utilisée pour mesurer la masse moléculaire moyenne du polymère et donc, suivre la dégradation en fonction du temps. De plus, en utilisant la spectroscopie RMN du proton homonucléaire découplée, les séquences stéréochimiques de la chaîne linéaire de l'acide poly (lactique) peuvent être identifiées et les ratios des blocs isotactiques et stéréotactiques peuvent être estimés. En conséquence, cette étude s'intéresse au processus de dégradation de deux acides poly (lactique) commerciaux dans l'air, l'eau et le sérum physiologique pendant 90 jours. L'influence de la structure chimique initiale du PLA (séquences stéréochimiques) sur le processus de dégradation a été clairement mise en évidence et la dépendance des quantités de L-lactide, D-lactide et méso-lactide dans la structure du PLA ont été estimées. La NMR a conduit à une meilleure compréhension des mécanismes de dégradation du polymère.

2. Abstract

Our previous studies demonstrated that poly(lactic acid) (PLA) air spun nanofiber mesh coatings could be advantageously used to promote monolayer endothelial cell growth on poly(ethylene terephthalate) vascular prostheses. PLA is one of the best candidate for this application because it slowly degrades, and could be thereafter gradually replaced by the extracellular matrix components. Thus, the key parameters for a successful replacement are both the mechanism and the rate of the poly(lactic acid) hydrolysis. Therefore in this study, the PLA degradation process was investigated using ^1H NMR spectroscopy. Contrary to classical analyses which are based on the crystallinity change (DSC, XRD) or on the molecular weight loss (GPC), NMR spectroscopy allows assessing the polymer degradation at a molecular level. Indeed, the analysis of ^1H NMR peak assigned to PLA end chain unit can be used to measure the polymer average molecular weight and consequently, follow the degradation. Moreover, by using homonuclear decoupled ^1H -NMR spectroscopy, stereosequences of the main poly(lactic acid) linear chain can be identified and isotactic and stereo-block ratios can be evaluated. Accordingly, this study investigated the degradation process of two different commercial poly(lactic acid)s in air, water and physiological serum environments during 90 days. The influence of the PLA initial chemical structure (stereosequences) on the degradation process was clearly evidenced and the time dependence of the relative amount of L-lactic, D-lactic, and meso-lactic units within the PLA structure was estimated. This NMR approach provides a better understanding of the polymer degradation mechanisms.

Keywords: poly(lactic acid), nanofibers, hydrolysis, stereosequences, ^1H -NMR, vascular prosthesis, air spinning

3. Introduction

Most commercial prostheses consist of expanded polytetrafluorethylene (ePTFE) tubes or woven or knitted constructs made of polyethylene terephthalate (PET). Although these prostheses exhibit relatively good mechanical properties (e.g., compliance [193,194] shear strength [195,196] etc.), they remain highly thrombogenic mainly due to the absence of neoendothelium formation [84,158]. Previous studies [158–160] have clearly demonstrated that the dimensional mismatch between the PET prosthesis surface features and those of endothelial cells must be taken into account to explain poor *in vitro* endothelialisation. In order to increase PET prosthesis endothelialisation, we recently developed an air-spinning device aimed at bridging the dimensional gap between the PET prosthesis textile surface and the endothelial cells [159,160]. This strategy permits to coat the internal surface of the synthetic prosthesis with polymeric nanofibers and to preserve the mechanical properties of PET prostheses.

In addition to bridge the dimensional mismatch between the PET prosthesis and endothelial cells, the polymeric matrix must be biocompatible [197–200]. In this regard, poly(lactic acid) (PLA) is one of the best candidates because it is widely accepted by the medical community, and also approved by the Food and Drug Administration (FDA). This linear polymer is generally obtained from the ring-opening polymerisation of the lactide molecule leading to lactic acid unit (Figure 29). Depending on this synthesis scheme and the initial ratio of lactide forms (L-lactide, D-lactide, and D,L-lactide = meso-lactide), the PLA chemical structure could become extremely complex with sequences of LL, DD or DL for only one unit ($n=1$), leading to various properties [201].

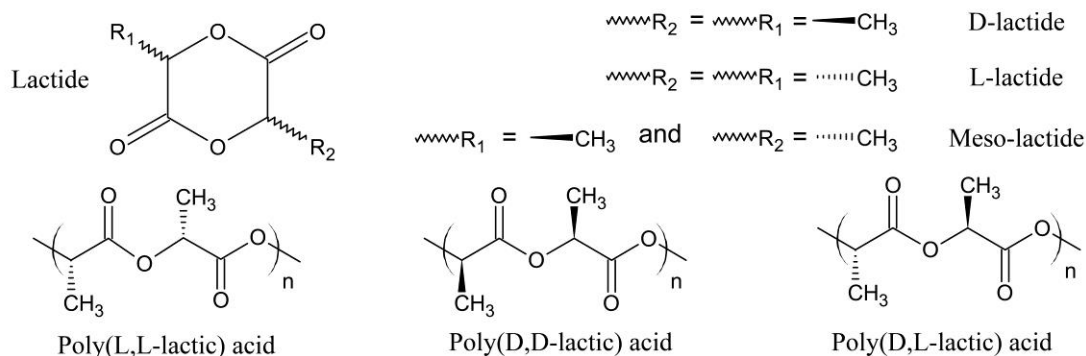


Figure 29. Lactide and PLA forms

Another important aspect is the biodegradable character of PLA. The PLA nano-scale surface should be suitable for cells proliferation and then be replaced by extracellular matrix components due to its degradation in a physiological environment. The main mechanism involved is its hydrolysis in the aqueous environment [202]. Various techniques were used to investigate the PLA degradation process with the objective of following the polymer molecular weight and/or crystallinity. The molecular weight loss during hydrolysis was essentially followed by gel permeation chromatography (GPC) [182,203–205], whereas the change of crystallinity during hydrolysis was assessed by differential scanning calorimetry (DSC) [204,206–210] and X-ray diffraction (XRD) [205]. All these techniques used for following the PLA degradation rate measured structural changes in the polymer without bringing much information on PLA hydrolysis mechanism. Furthermore, most of these PLA investigations did not take into account variations in residues content, which could occur during the ring opening polymerisation process, residues that influenced the polymer hydrolysis rate. In fact, one of the only publications that with are aware of on this subject is that of Saha et al. which have demonstrated that small amounts of D-lactic units in a PLLA chain increase the degradation rate [182].

To our knowledge, the approach which consists in following the influence of the different stereosequences present in a random PLA linear chain during the degradation process has not been described in literature. In this context, we have used two different commercial PLAs and followed their degradation in different media to determine also the influence of

the environment on its hydrolysis process. A molecular approach has been therefore chosen by using a powerful technique such as ^1H NMR. This technique was often used for studying PLA polymerisation. Surprisingly, few studies reported the utilization of ^1H -NMR to investigate PLA degradation [200,211–214]. By using homonuclear decoupled ^1H -NMR technique, the stereosequences of the main poly(lactic acid) linear chain can be revealed, identified and followed during degradation process through the determination of the different stereosequence ratios. On one hand, many physical and mechanical properties depend on stereosequences ratios and distribution. On the other hand, the stereosequences distribution is directly related to stereochemical composition of the lactide mixture used in the polymerisation process [190].

Finally, the ^1H -NMR spectra were used to estimate the time dependence evolution of the L-lactic, D-lactic, and D,L-lactic units within the PLA structure, which provides a better understanding of this polymer degradation mechanism.

4. Materials and Methods

4.1 Materials

Two poly(lactic acid)s (PLA) were purchased from Hycail Finland Oy (Torku, Finland) (PLA1) and Biomer (Biomer L9000, Krailling, Germany) (PLA2). The two products were solubilised in chloroform (99.99%, Carl Roth, Strasbourg, France). Once the PLA was completely solubilised, the solution was injected into an air-spinning apparatus that is described elsewhere [159].

4.2 Methods

4.2.1 Air spinning process condition

In a previous study, the nanofibers' dimensional characteristics were shown to depend on air pressure, flow rate, and polymer solution concentration [159]. Accordingly, PLA nanofibers were prepared using previously optimized parameters and an air pressure of 5 MPa with a flow rate of 10 mL/h at a PLA concentration of 4% (w/v).

4.2.2 Sample preparation

PLA nanofibers were collected in glass beakers and kept in three different media: air (AIR), deionized water (Water), and physiologic serum (PS) (NaCl 0.9%, Cooper, Melun, France), then placed under vacuum at 37°C. Following the ageing procedures, fibers (AIR, Water, and PS) were collected and dissolved in 4 mL of chloroform. The solvent was then removed in a rotary evaporator for 30 min at 40°C and the PLA residues were subsequently dried over a vacuum pump for 30 min to eliminate water residuals.

4.2.3 NMR measurements

The ^1H -NMR spectra were recorded by means of a high resolution Brüker AVANCE 400 MHz spectrometer at room temperature with a classical 1D sequence. Chemical shifts are given on the δ scale and are referenced to tetramethylsilane (TMS) at 0 ppm. Acquisition time was 4 sec, relaxation delay between each pulse was 8 sec, and the pulse lasted 2.1 μs for a 30° flip angle. The presented NMR spectra are the result of the co-addition of 2000 scans on a spectral window of 8250.83 Hz (20.18 ppm). Data were acquired with a digital resolution of 0.12 Hz/point and 64 Kpts were used for both data acquisition and Fourier transform treatment. PLA samples were totally dissolved in 0.7 mL of deuterated chloroform (99.8%, Euriso-top, Gif-sur-Yvette, France) and the solutions were transferred into a 5-mm diameter NMR tube. ^1H -NMR spectra were recorded for each sample every 15 days for 90 days following fabrication. Spectra of the PLA pellets (PLA1 and PLA2 before spinning) were also measured to ascertain the effect of the spinning process on PLA degradation.

After 0, 45, and 90 days, the ^1H NMR spectra were acquired with the methyl proton decoupled from the methine protons in order for us to observe the polymer chain stereospecificity evolution. Spectra were analyzed with ACD/Labs 12.0 software (Advanced Chemistry Development, Toronto, ON, Canada).

4.2.4 PLA molecular weight

The molecular weight (M_n) measurement using a classical ^1H -NMR technique was chosen as the criterion to study the evolution of PLA degradation. The polymer molecular weight determination procedure basically consists in comparing relative proton resonance intensities arising from methine groups located both in the polymer backbone and at the end of the polymer chain using the following Equation (Equation 9):

$$M_{n_i} = \frac{100}{M_{n_0}} \left(M \frac{I_{1i}}{I_{2i}} + M_f \right) \quad (\text{Eq. 9})$$

where M_{n_0} is the molecular weight for $t = 0$ days in g/mol, M_{n_i} is the proportion of molecular weight for $t = i$ days in %, I_{1i} is the integral of CH group peaks for $t = i$ days, I_{2i} is the integral of CH end-group peaks for $t = i$ days, M is the molar mass of the main chain monomer in g/mol and M_f is the molar mass of the end-chain monomer in g/mol.

The error has been estimated at 3% on the molecular weight calculation.

4.2.5 Stereosequence evolution determination

Many authors [215,216] have shown that stereosequence ratios are interdependent and are described by a Bernoullian distribution. Briefly, each NMR peak originating from the CH groups of the main chain bonded to methyl groups can be assigned to a block of four or six monomers. The relative amount of each detected stereosequence was expressed as [217,218] (Equation 10):

$$(isisi)_{\%} = (iisii)_{\%} = \frac{(isi)_{\%}}{2} \quad (\text{Eq. 10})$$

where i and s are isotactic (LL or DD) or syndiotactic (LD or DL) pairs of monomers, respectively.

This stereosequence characterisation allowed for an estimation of the relative amount of L-form, D-form, and meso-form within the polymer structure. In this context, one possible approach [217,219] consists in using what is referred to as a PLA calculation. This method is based on the Monte Carlo calculation and was primarily used to evaluate the fraction of

PLA forms (LL, DD, and DL) following a ring-opening polymerisation with different ratios of the diastereoisomer forms of lactide dimer (e.g., L-lactide, D-lactide, and meso-lactide). Thakur et al. [217] developed a procedure from the connections between hexad block ratios and the Monte Carlo calculation which is well described by these authors.

5. Results and discussion

5.1 Spectral identification and PLA characterisation

Figure 30 displays the ^1H -NMR spectra of PLA1 and PLA2 in the $\delta = 4\text{--}6$ ppm region which essentially exhibits the signals originating from the methine protons. As seen in this Figure, the CH groups located within the PLA chain exhibited a very strong NMR signal close to 5.2 ppm, while the CH moieties from the polymer chain ends gave rise to a weak, yet easily detectable signal near 4.35 ppm. The relative intensities of these NMR features could thus be used to monitor PLA molecular weight. Indeed, the CH group from the main chain was bonded to an OCO group, while the CH end-group was bonded to OH moieties. In addition, they did not have the same chemical environment and their NMR chemical shifts were different [220].

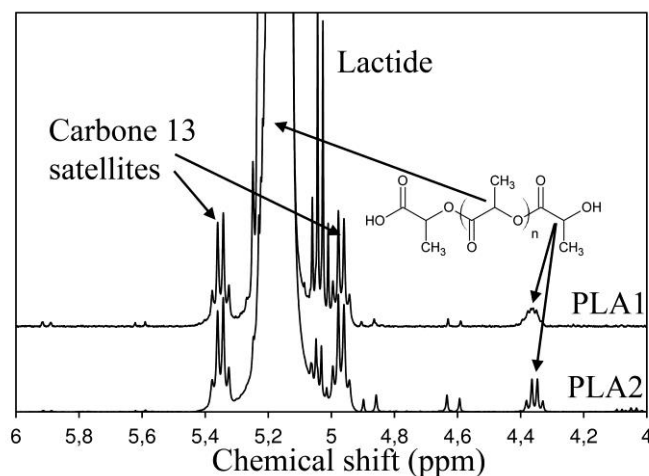


Figure 30. PLA1 and PLA2 ^1H -NMR spectra ($\delta = 4\text{--}6$ ppm) at 0 days

It is worthy of note that the NMR experiments were performed on the PLA1 and the PLA2 both before and after spinning with no difference observed in the spectra (results not shown), therefore indicating that the spinning process did not modify the molecular structure of PLA materials. Molecular weight calculations of both PLAs from their NMR spectra provided values of approximately 50 000 g/mol (Table 1).

The quadruplet located between 5 ppm and 5.1 ppm was previously associated to lactide (Figure 31), thus indicating an incomplete polymerization reaction. In addition, the presence of lactide was clearly more evident in PLA1 than in PLA2 (about 5 times more).

The second step of the initial PLAs' characterisations consisted in stereosequence characterization. Indeed, Ovitt et al. have demonstrated that ring opening polymerisation with mixture of lactide forms leads to a stereoselectivity in the PLA molecular structure [221]. The assignments of the stereosequences and their respective amounts were therefore determined according to the literature [222].

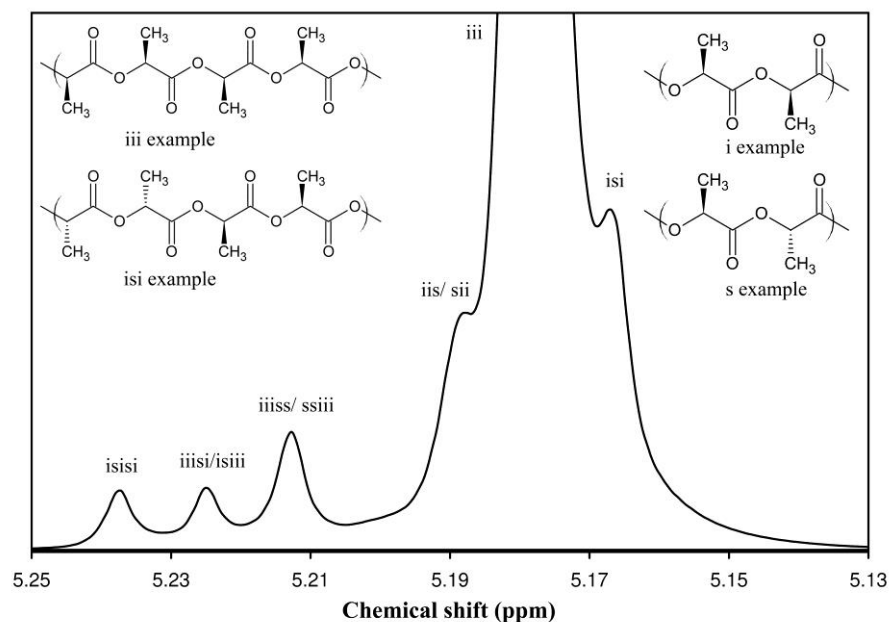


Figure 31. Homonuclear decoupled ^1H NMR spectrum of the methine region ($\delta = 5.13\text{-}5.25$ ppm) and stereosequence identification.

Figure 31 shows a typical homonuclear ^1H -NMR spectrum of PLA1 and PLA2 in the region where methine proton resonances are observed. These data clearly demonstrate that the iii stereosequences (5.181 ppm) were predominant compared to the other five blocks (tetrads or hexads), thus confirming that PLA essentially consisted in a majority of isotactic blocks of L or D isomers. Curve fitting, with a Gaussian profile of the NMR features arising from the isisi (5.240 ppm), iiisi/isiii (5.228 ppm), iiiss/ssiii (5.216 ppm), and iii (5.181 ppm) blocks, allowed estimations of the relative content of the six aforementioned stereosequences (calculation described in the experimental part - Equation 10). From the isisi, iiisi/isiii, and iiiss/ssiii contents, a relative amount of LL, DD and DL units in each investigated polymer can be therefore determined. The results of these calculations are summarised in table 1.

Table 1. Composition of PLA1 and PLA2 before hydrolysis

PLA composition	PLA1	PLA2
Mn (g/mol)	49726	51148
(Equation 9)		
(iii)% (Equation 10)	88.5 ± 0.4	95.4 ± 0.4
(isi)% (Equation 10)	3.4 ± 0.1	1.3 ± 0.2
LL units (%)	89.0 ± 0.2	96.1 ± 0.2
DL units (%)	7.1 ± 0.4	2.6 ± 0.3
DD units (%)	3.8 ± 0.2	1.4 ± 0.2

These results clearly exhibited that the proportion of iii, isi as well as LL, DD and DL units were different in PLA1 and PLA2. It could be explained either by the fact that the polymerisation process was performed using different L-lactide and D-lactide proportions or from difference in experimental parameters used during the polymerization process. As clearly evidenced by our data, PLA2 has a composition richer in isotactic blocks (iii) and in LL units compared to PLA1 (table 1).

5.2 Global degradation of the PLA

The hydrolysis of PLA leads to polymer fragmentations that can be followed by ^1H NMR (Figure 33).

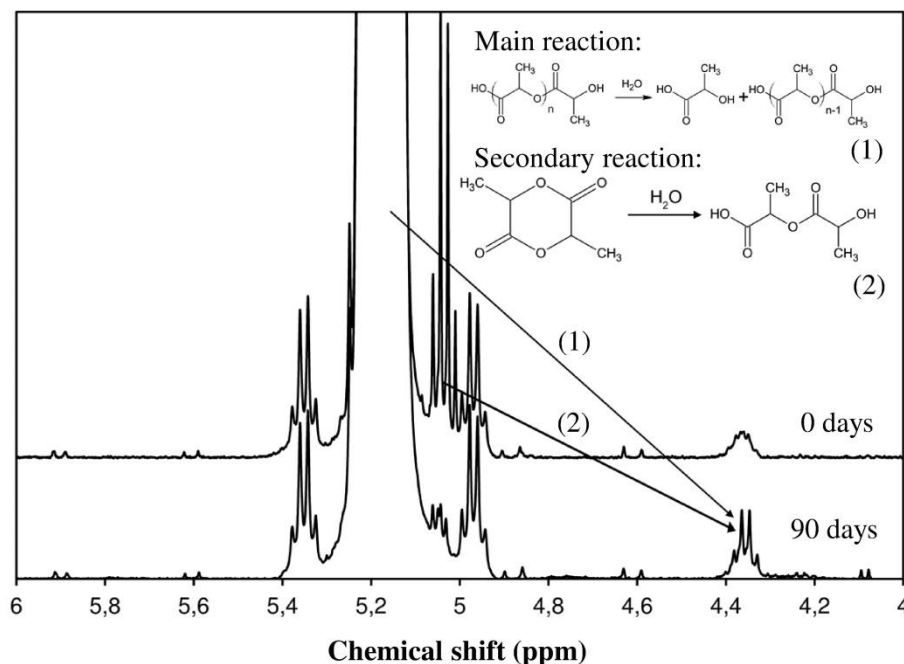


Figure 32. PLA degradation process followed by ^1H -NMR spectroscopy after 90 days of hydrolysis in physiological serum

The main reaction (1), described in Figure 32, during the hydrolysis process is the scission of PLA in lower molecular weight fragments which leads to a decrease of the ratio of methine groups in long PLA chains (at 5.2 ppm) on that of methine groups in this polymer chain ends (at 4.35 ppm). Accordingly, the molecular weight variations (calculated from Equation 9 described in the experimental part) can be estimated and therefore, the degradation kinetics of PLA1 and PLA2 can be assessed (Figure 33).

The NMR spectra also indicate the aqueous conversion of lactide residues in PLA oligomers (lactoyllactic acid), as evidenced by the decreased of intensity of the features assigned to these molecules at 5.1 ppm (Figure 32). It is likely that the interaction of water

with lactide led to a cycle opening to form lactoyllactic acid [223], which in turn could reacted with the PLA chain ends and gave rise to an increased intensity and a shape modification of the NMR CH peak located at 4.3 ppm (reaction 2 in Figure 32).

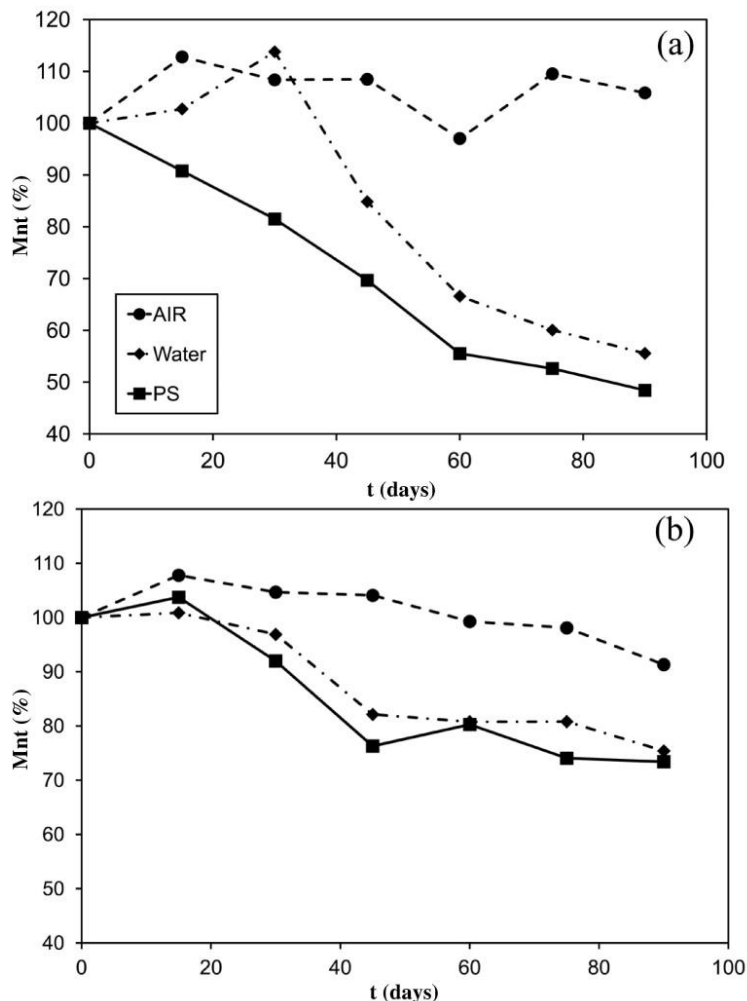


Figure 33. Hydrolysis kinetics, following by ^1H -NMR spectroscopy, for PLA1 (a) and PLA2 (b)

Figure 33 clearly exhibits that the PLA molecular weight decreased when immersed in either water or saline (PS) solution during several weeks for both PLA compared to the sample control aged in air. Thereby, this observation confirmed that the polymer backbone broke into lower molecular weight oligomers upon exposure to aqueous environments, in

agreement with previous published results [182,207,224–226]. In addition, the salt content in the physiological serum solution clearly increased PLA degradation, especially for PLA1. Furthermore at this step, it clearly appeared that the PLA1 and PLA2 have different degradation behaviours: the PLA1 molecular weight loss reached 40-50% (Figure 33a) whereas for PLA2 the maximum of degradation was 25-30% (Figure 33b). This degradation difference observed between PLA1 and PLA2 in aqueous media is particularly of interest since, as aforementioned, PLA1 and PLA2 have similar molecular weight around 50 000g/mol. Therefore, these degradation differences may be somewhat related to the aforesaid conformational difference between these two PLAs (Table 1).

5.3 The role of stereosequence and isomer ratios in PLA degradation

The ratios of the *iii* and *isi* stereosequences were evaluated at 0, 45 and 90 days of degradation (Figure 34). Thereafter, the fractions of LL, DD and DL units were calculated from the hexad stereosequence results with the Monte Carlo simulation (Figure 35).

First, it should be noticed in Figures 34 and 35 that no significant variations were observed when the degradation process occurred in air, whereas the PLA degradation in aqueous environment, water or saline solution, led to changes in stereosequences (Figure 34) and units compositions (Figure 35).

As shown in Figure 34, the aqueous environment, water or saline solution, did not appear to have a significant effect on the PLA stereosequences. Indeed, the isotactic stereosequence ratio decreased in both solutions for both PLAs: ~ 6% for PLA1 (Figure 34a) and ~ 3% for PLA2 (Figure 34b). Whereas a slight increase in stereoblock *isi* ratio was noticed whatever the aqueous solution, from 3.4% to 5% for PLA1 (Figure 34c) and from 1.2% to a maximum of about 2% for PLA2 (Figure 34d).

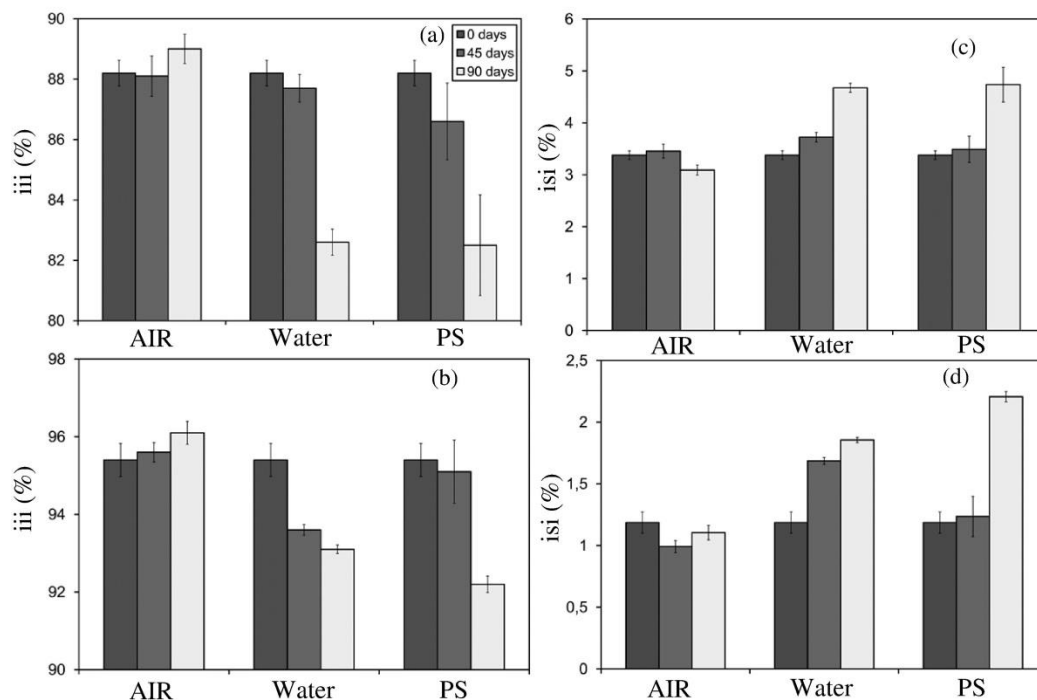


Figure 34. Evolutions of isotactic block (iii) for PLA1 (a) and PLA2 (b) and of stereoblocks (isi) for PLA1 (c) and PLA2 (d).

Figure 35 exhibits a significant decrease in LL units for both PLA and in both water and PS solutions, especially after 90 days: the compositions in LL units decreased from ~ 88% to ~ 82% and from ~ 96% to ~ 94% for PLA1 and PLA2, respectively. Since the amount of LL units in PLA1 and PLA2 was reduced during hydrolysis, the ratios in DL and DD units were increased (data not shown).

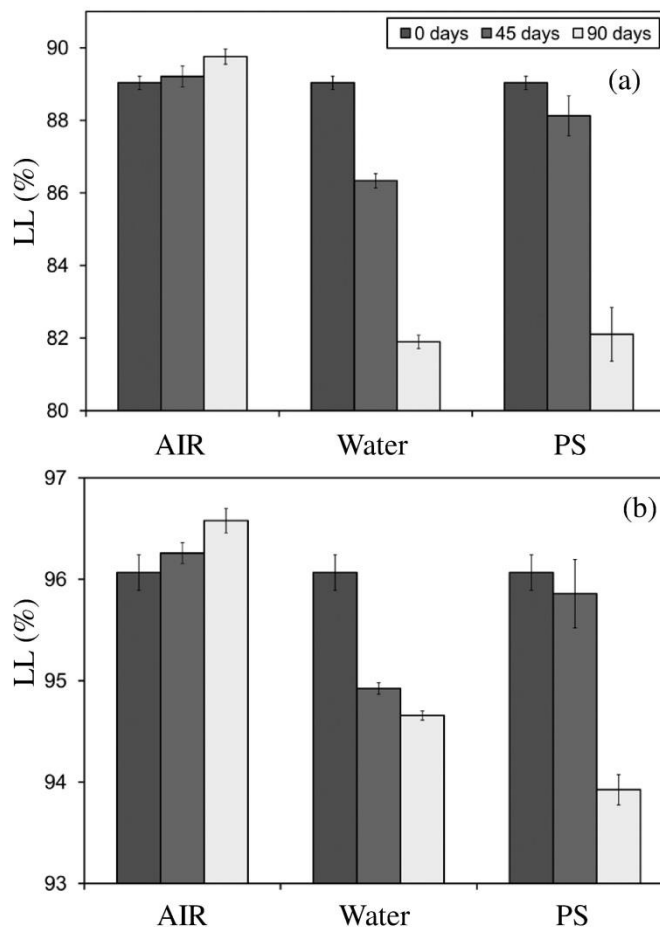


Figure 35. Evolution of the amount of LL unit for PLA1 (a) and PLA2 (b) calculated with a Monte Carlo simulation.

The results on PLA stereosequence evolution (Figure 34) highlight that the isotactic blocks (iii) were hydrolysed more rapidly than stereoblocks (isi). This phenomenon is in agreement with literature [191,201]. Stereocomplexed PLA, meaning 100% of isi configuration, is more resistant to hydrolysis compared to other PLA conformations. The explanation lies in the formation of PLA hydrogen bonds during the hydrolysis reaction. As a matter of fact, Karst et al. [190,191] reported that hydrogen bonds and dipole-dipole interactions are stronger in a stereocomplex polyblend than in pure isotactic PLAs. This explanation could be applied for several sequences in the polymer backbone and consequently, stereoblock units are more resistant to hydrolysis than other PLA sequence

blocks. Thus, the nature of stereosequences formed during polymerisation must be taken into account to control the hydrolysis degradation reaction. For both PLA1 and PLA2, the D-lactide form proportion was found to be initially low and therefore, the capability of forming stereoblock units was also very low, although not being insignificant. Consequently, stereoblock tetrads are randomly located in the main chain. LL units that have not formed a stereoblock with DD units may thus be the firsts to undergo hydrolysis.

The literature [182] also suggests that the DD units in a PLA chain could accelerate cleavages in the first weeks of the hydrolysis process. In parallel, PLA1 and PLA2 are predominantly compounded with LL units which are statistically more prone to cleave (Figure 35). Indeed, LD and DD units are randomly distributed in the PLA backbone creating non-isotactic stereosequences and some of these sequences, especially stereoblock sequences, are more stable than isotactic sequences. Consequently, LL units, mainly involved in isotactic sequences, decrease during hydrolytic degradation.

Nonetheless, this stereochemical analysis cannot alone explain the PLA degradation mechanisms in aqueous media especially the correlation between stereosequence evolution results upon PLA degradation (Figure 34) and the decrease of global molecular weight (Figure 33). Thus other parameters, such as cristallinity, may intervene during PLA degradation. This will be the subject of future investigations.

6. Conclusion

¹H-NMR spectroscopy is a very well suited technique for studying PLA stereochemistry and degradation behaviour. Classical ¹H-NMR spectroscopy has permitted to measure the time-dependence degradation of two commercial PLAs in different media. The spectral analysis clearly demonstrated that ageing in either water or physiological solution led to polymer chain hydrolysis, as evidenced by the polymer molecular weight decrease over time. The ¹H-NMR measurements have also showed that the two PLAs displayed different behaviours in terms of resistance to hydrolysis. The presence of lactide, its concentration evolution with time, and its transformation due to hydrolysis has been identified and now

must be further investigated. Homonuclear decoupled ^1H -NMR spectroscopy enabled gaining significant knowledge with regard to the evolution of PLA stereochemistry upon hydrolysis. For example, both investigated PLAs presented noteworthy differences in terms of stereosequence ratios and LL units' evolution upon degradation since our data demonstrated that isotactic blocks were hydrolyzed at the expense of stereoblocks. Nonetheless, this sole stereochemical analysis cannot fully explain the PLA degradation mechanisms in aqueous media since other parameters, such as the presence of residual lactide and polymer crystallinity, may intervene during PLA degradation. In this context, further studies will further focus on the commercial PLA degradation mechanisms for future use of this polymer in biomedical applications

7. Acknowledgements

Authors express their gratitude to R. Mir for his guidance. G. Sabbatier would like to thank Alsace Region for his financial support. The financial contribution of the *Centre Québécois sur les Matériaux Fonctionnels* is also greatly acknowledged.

Chapitre IV. Évaluation d'un système de filage par jet d'air pour produire des échafaudages de nanofibres biosynthétiques optimisés

Evaluation of an air spinning process to produce tailored biosynthetic nanofibre scaffolds

Gad Sabbatier ^{1,2,3}, Pierre Abadie ^{2,3}, Florence Dieval ¹, Bernard Durand ¹ and Gaétan Laroche ^{2,3,*}

¹ Laboratoire de Physique et Mécanique Textile, Université de Haute Alsace, École Nationale Supérieure d'Ingénieurs du Sud Alsace, 68093 Mulhouse Cedex, France.

² Laboratoire d'Ingénierie de Surface, Centre de Recherche sur les Matériaux Avancés, Département de génie des mines, de la métallurgie et des matériaux, Université Laval, Québec (QC), G1V 0A6, Canada.

³ Centre de recherche du CHU de Québec, Hôpital St François d'Assise, Québec (QC), G1L 3L5, Canada.

Published in Material Science and Engineering: Part. C

November 2013

* Corresponding Author : Gaétan Laroche, Laboratoire d'Ingénierie de Surface, Centre de recherche du CHU de Québec, Hôpital St-François d'Assise, 10 rue de l'Espinay, Québec G1L 3L5 Québec, Canada. E-mail : gaetan.laroche@gmn.ulaval.ca

1. Résumé

Dans ce travail, les paramètres d'entrée d'un appareillage innovant de filage par jet d'air afin de produire des échafaudages de nanofibres de polymère pour des applications en ingénierie tissulaire ont été optimisés. La microscopie électronique à balayage a permis d'identifier, dans les fibres, plusieurs morphologies d'échafaudages, basées sur le rapport entre la surface occupée spécifiquement par les fibres et la surface occupée par l'échafaudage de polymère. Les valeurs des paramètres de concentration et de diamètre d'aiguille permettant la production d'échafaudages produits avec un rapport supérieur à 90 % de la surface recouverte par des fibres ont été retenues pour la suite de l'étude. Une analyse par régression multilinéaire a été utilisée pour mettre en évidence la relation entre le diamètre des nanofibres et les paramètres de filage. La concentration de la solution de polymère est considérée comme le paramètre le plus significatif pour contrôler le diamètre des fibres durant le processus de filage, malgré l'interaction entre les paramètres expérimentaux. A partir de ces résultats, des mesures de viscosité ont permis de clarifier l'influence des propriétés de la solution polymérique sur la morphologie des échafaudages.

2. Abstract

We optimised the working parameters of an innovative air spinning device to produce nanofibrous polymer scaffolds for tissue engineering applications. Scanning electron microscopy was performed on the fibre scaffolds which were then used to identify various scaffold morphologies based on the ratio of surface occupied by the polymer fibres on that covered by the entire polymer scaffold assembly. Scaffolds were then produced with the spinning experimental parameters, resulting in 90% of fibres in the overall polymer construct, and were subsequently used to perform a multiple linear regression analysis to highlight the relationship between nanofibre diameter and the air spinning parameters. Polymer solution concentration was deemed as the most significant parameter to control fibre diameter during the spinning process, despite interactions between experimental parameters. Based on these findings, viscosity measurements were performed to clarify the effect of the polymer solution property on scaffold morphology.

3. Graphical Abstract

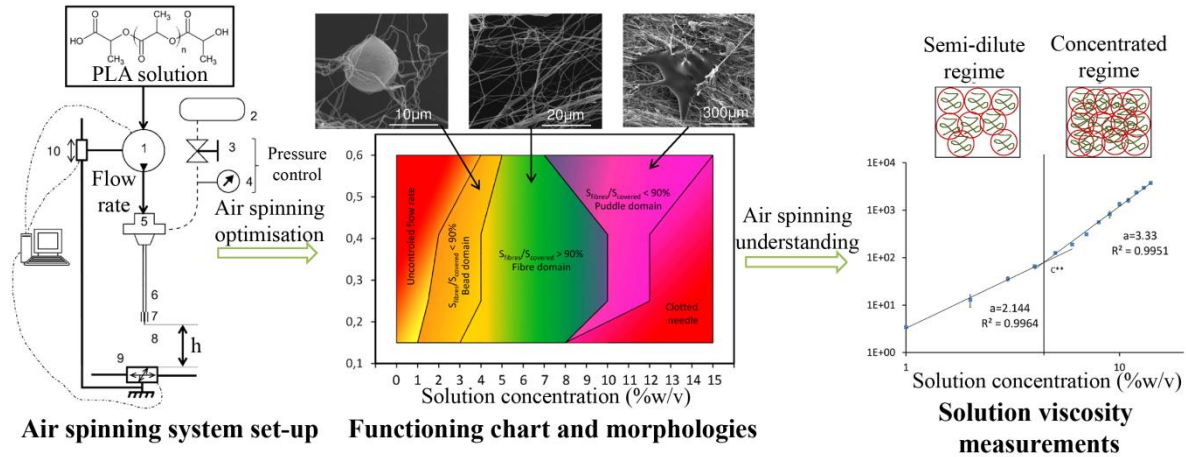


Figure 36. Résumé graphique du chapitre IV

Keywords: Nanofibre scaffold, spinning, poly(lactic acid), multilinear regression, vascular regenerative medicine.

4. Introduction

In the most serious cases of vascular disease, surgeons have no choice but to replace the arteries with vascular prostheses [227,228] which are manufactured in either woven or knitted polyethylene terephthalate (PET) or microporous expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) and are used to replace arteries with a diameter greater than 6 mm. For smaller diameters, no long-term solution exists for artery replacement [229], primarily because these materials are highly thrombogenic. Indeed, when the surface of the material is in contact with blood, coagulation factors are activated which leads to blood clot formation [230]. This foreign-body reaction [77] can be avoided that the prosthesis is able to accommodate an endothelial cell monolayer that resembles the inner surface of the artery.

Our previous studies have demonstrated the ineffectiveness of endothelial cell monolayer growth on the textile structure of prostheses due to a dimensional mismatch between prosthesis structure scale and cell size [158]. Our strategy is to bridge this mismatch by coating the internal surface of the prosthetic tube with a polymeric nanofibre scaffold to produce a temporary synthetic extracellular matrix [159]. In addition to making it possible for endothelial cells to adhere and proliferate, this coating helps preserve the mechanical properties of the prosthesis.

Choosing the right polymer for this coating is crucial [231]. The polymer must be biocompatible and easy to produce. In this regard, high molecular weight poly(lactic acid) (PLA) is an ideal candidate, as medical devices made with this polymer are approved by the Food and Drug Administration [197] and is commonly deployed in medical and paramedical applications. Used as suture thread for many years [232], PLA was recently shown to provide an alternative to permanent stents [233,234], and it is also a suitable polymer for drug delivery applications [235] due to its biodegradation features. This aliphatic polyester consists of a linear chain synthesised by the ring opening polymerisation and polycondensation of the lactide dimer. Thanks to its ester-containing structure, this polymer can be degraded through hydrolysis and its degradation rate can be tailored to meet the requirements of each application [236,237].

The most common method to produce nanofibres is the electrospinning process [161]. In this technology, a high voltage is applied between a needle and a collector to draw fibres from a solution. This easy process has been widely studied and can produce either classical or porous [238] synthetic and natural fibres. More complex morphologies have been spun, such as composite fibres [239], core-shell fibres [240], and ceramics, as well as carbon nanotubes and nanofibres [241]. The shape morphology can also be controlled to produce unidirectional and multidirectional patterns [242]. Finally, the variety of yarns and shapes provide a wide range of applications in numerous scientific fields.

Despite the definite advantages of electrospinning, this method cannot readily be used to coat the luminal surface of a tubular textile vascular prosthesis [159] because of the small distances between the needle and the surface. To address this issue, we developed an alternative device, called air spinning which involves the stretching of a polymer solution under high-speed air flow. This technique was introduced by our group in 2008 [159] and has been continuously upgraded for the coating of tubular shapes [160].

Nanofibre technology is extensively used in biomedical and tissue engineering applications [243], as well as in bone and cartilage applications [244,245], in skin regenerative medicine [246] or cardiac tissue repair applications [247]. Nanofibres are now being formed as scaffolds to promote cell adhesion and proliferation and also differentiation [248] and guided migration [249], and their surface and physical properties are tuneable to target protein adsorption [250]. In addition, natural or synthetic scaffolds can be functionalised to add biomimicry and improve bioactivity [251].

François et al. [159] showed that cell behaviour depends on the quality of the air-spun nanofibre scaffold which can be determined by the number of fibre fractures, fibre diameter, and scaffold morphology. In a previous study [159], Fibre ruptures were quantified and correlated with spinning parameters, yet no information was provided as to fibre diameter and scaffold morphology with the air-spinning device. Oliveira et al. [252] characterised solution blow-spinning using a system similar to the one previously developed in our laboratory. These authors correlated blow-spinning parameters with fibre

diameter but with a different set of parameter ranges. Moreover, some important parameters, such as needle diameter and substrate/needle distance were not considered.

The aim of this study was thus to further the state of knowledge regarding the air spinning process to better understand fibre formation, optimise spinning parameters for a more uniform fibre shape, and develop methods and tools to predict optimal spinning conditions.

5. Materials and methods

5.1 Air spinning process and parameters

PLA ($M_w = 150000$, $I_p = 2.45$, $D/L = 4.5\%$, $T_g = 61^\circ\text{C}$, $T_m = 144^\circ\text{C}$, CML poly(lactic acid), Hycail Finland Oy, Turku, Finland) was totally solubilised in chloroform (99.8%, Laboratoire Mat, Québec, QC, Canada) and injected into an air spinning device (Figure 37, [159]). The PLA solutions were then stretched under high-speed air flow and pulverised on PET films that were fastened onto the collector (Goodfellow, Oakdale, PA, USA). The polymer solution residence in the air flow enabled the nanofibres to form upon solvent evaporation.

The air spinning apparatus was equipped with a flow control syringe pump (NE-1010, New Era Pump System, Farmingdale, NY, USA) and a 20 mL luer lock glass syringe containing the polymer solutions. The syringe was first mounted onto an injector equipped with a small needle (1/2" Straight Cannula Crimp Sealed, I&J Fisnar, Wayne, NJ, USA), then attached to a homemade atomiser fed with compressed medical-grade air. The nanofibre coating was homogeneously settled on the collector with X and Y computerised translation stages (Velmex, Bloomfield, NY, USA).

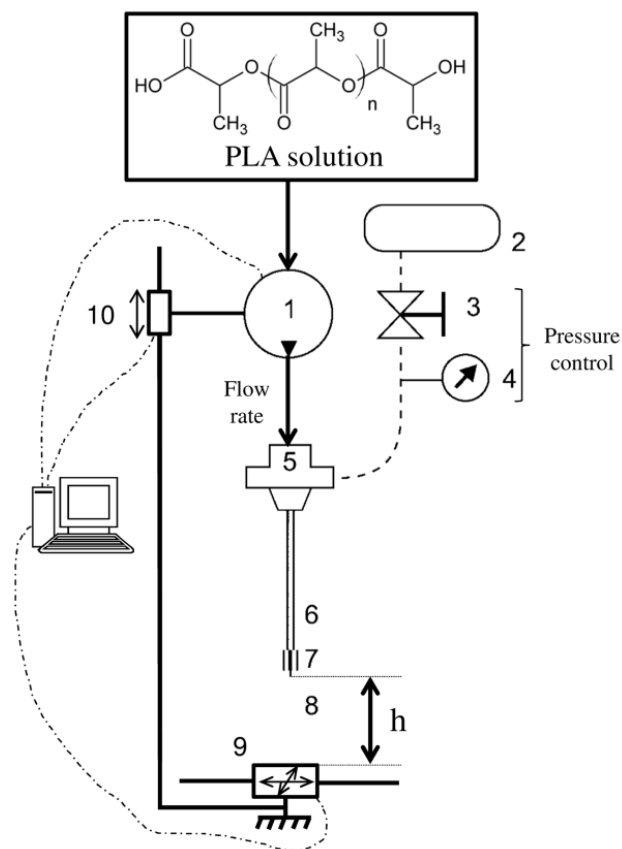


Figure 37. Air spinning system set-up. (1) syringe pump; (2) compressed air tank; (3) air valve; (4) manometer; (5) atomiser; (6) injector with small needle; (7) nozzle; (8) pulverisation cone; (9) XY translation stage and collector; and (10) Z-stage.

The effect of polymer solution concentration, needle diameter, flow rate, pressure, and nozzle-to-sample distance was investigated in terms of its influence on fibre diameter, with the ranges determined either from previous studies [159] or on the basis of physical constraints. Flow rates and pressure values were set accordingly between 10 mL/h and 50 mL/h and between 5 MPa and 10 MPa, respectively, while polymer solutions were investigated at concentrations ranging between 1% and 15% to enable flow rate control in the lower diameter needle (0.15 mm) while preventing clotting in the higher diameter one. The nozzle-to-sample distance values were set at between 200mm and 300 mm, as a previous study by our group demonstrated that these lengths were sufficient to produce solvent-free polymer fibres.

5.2 Morphology study and fibre diameter measurements

Thirteen solutions of varying PLA concentrations (1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, and 15% w/v) were randomly air-spun with four needles of different diameters (0.6, 0.41, 0.25, and 0.15 mm). For this section of the experiment, flow rate, air pressure, and nozzle-to-sample distance (h) were kept constant at 10 mL/h, 5 MPa, and 200 mm, respectively. Each sample was duplicated, gold-coated, and subsequently observed under a scanning electron microscope (JSM840A, JEOL, Tokyo, Japan). Three images per sample were randomly taken at a magnitude of 1000 for the morphology study and either 3000 or 10000 for the fibre diameter measurements. Each image was then analysed with image treatment software (Image J, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The ratio between the surface covered by the fibres (S_{fibres}) and the surface covered after spinning (S_{covered}) was then calculated.

Finally, approximately 25 fibre diameters were evaluated per image for an approximate total of 150 diameter measurements for each experiment. The measurements were compared with a Gaussian profile to determine the relevance of using the diameter average for the rest of the study, which was a condition to performing a statistical analysis.

5.3 Experimental design and statistical analysis

A least squares multiple linear regression was performed to determine the relationship between the spinning experimental parameters and the fibre diameter. This method consists in fitting an experimental parametric model with a linear mathematical model. The calculation of estimated regression parameters of this model is established by the following Equation (Equation 11):

$$\hat{\underline{\beta}} = (\underline{X}^T \underline{X})^{-1} \underline{X}^T \underline{Y} \quad (\text{Eq. 11})$$

where, $\hat{\underline{\beta}}$ is the vector of the estimated regression coefficient values, $\underline{X}$ is the parameter matrix, and $\underline{Y}$ is the vector of responses.

Model robustness was then statistically evaluated [253]. First, an analysis of variance was performed to ascertain model significance. The hypothesis that at least one of the regression coefficients was significant was ascertained through the validation of Equation 12:

$$\frac{MSR}{MSE} > F((p - 1); (n - p)) \quad (\text{Eq. 12})$$

where MSR is the regression mean square, MSE is the mean square error, $F((p - 1); (n - p))$ is the F-test value, p is the number of parameters, and n is the number of experiments. The F-test was performed with a level of confidence of 5%.

Thereafter, the statistically non-significant parameters were rejected with a confidence interval analysis on the estimated regression coefficient values. The confidence interval was calculated by $\hat{\beta}_i \pm t_{\frac{\alpha}{2}, n-p} \sqrt{C_{ii} \times MSE}$, where $\hat{\beta}_i$ is the regression coefficient value for parameter i , C_{ii} is the diagonal value of $\underline{C} = (\underline{X}^T \underline{X})^{-1}$ for parameter i , and $t_{\frac{\alpha}{2}, n-p}$ represents the t-test value for a confidence interval of α . Parameters leading to a confidence interval less than 5% were rejected from the model.

Finally, three models were normalised and compared to identify the most accurate one. The first (M1) and second models (M2) consisted of working on two-level interactions which consisted of 32 experiments. Eight experiments were added to test a quadrature model (Table 2b), which resulted in a third model (M3).

Table 2 : Experimental designs

2⁵ Factorial experiment design values (a)				Added values (b)	
Variables	Parameters	X ₋	X ₊	X ₋	X ₊
X _C	Concentration (%w/v)	4	10	7	7
X _D	Needle diameter (mm)	0.25	0.41	0.25	0.41
X _P	Air pressure (MPa)	5	10	5	10
X _F	Flow rate (mL/h)	10	50	10	50
X _h	Distance h (mm)	200	300	200	200

5.4 Viscosity measurements

Statistical analyses highlighted the effect of the solution properties and consequently, PLA solution viscosity was measured by means of a shear stress rheometer (ARES-G2, TA Instruments, New Castle, DE, USA) at 25°C at an imposed shear stress speed ranging between 1 s⁻¹ and 1000 s⁻¹. Standard 2° cone and plate geometry with a 60 mm diameter was used to apply the shear stress. Viscosity was established for PLA solutions at various concentrations in the permanent regime. Because the dynamic viscosity remained constant, each solution was considered as a Newtonian fluid (results not shown) on the scale. The total measurement time totalizes approximately 600s but values at 1 s⁻¹ were taken into account for calculation. Specific viscosity of the PLA was then calculated to eliminate the solvent effect using the following Equation (Equation 13):

$$\vartheta_{sp} = \frac{\vartheta_{dyn} - \vartheta_{solvent}}{\vartheta_{solvent}} \quad (\text{Eq. 13})$$

where ϑ_{sp} is the specific viscosity, ϑ_{dyn} is the dynamic viscosity of the solution (in Pa.s) chloroform, and $\vartheta_{solvent}$ is the viscosity of chloroform (in Pa.s).

The polymer solution regimes were highlighted with power profiles of specific viscosity, as a function of concentration, and the best fitted curves were retained.

6. Results

6.1 Morphology study

For the sake of discussion, spinnability regimes are considered to be those during which PLA nanofibres can be obtained, regardless of the formation of beads or puddles. The puddles in our experiment were defined by macroscopic elements inside the scaffold that were easily visible to the naked eye. Figures 39a, 39b, and 39c present typical images of the air-spun PLA polymer solutions. Figures 39a and 39c display the so-called beads and puddles, respectively, which constituted undesired elements for the targeted biomedical

application and were the result of two different instabilities during the spinning process (see discussion section).

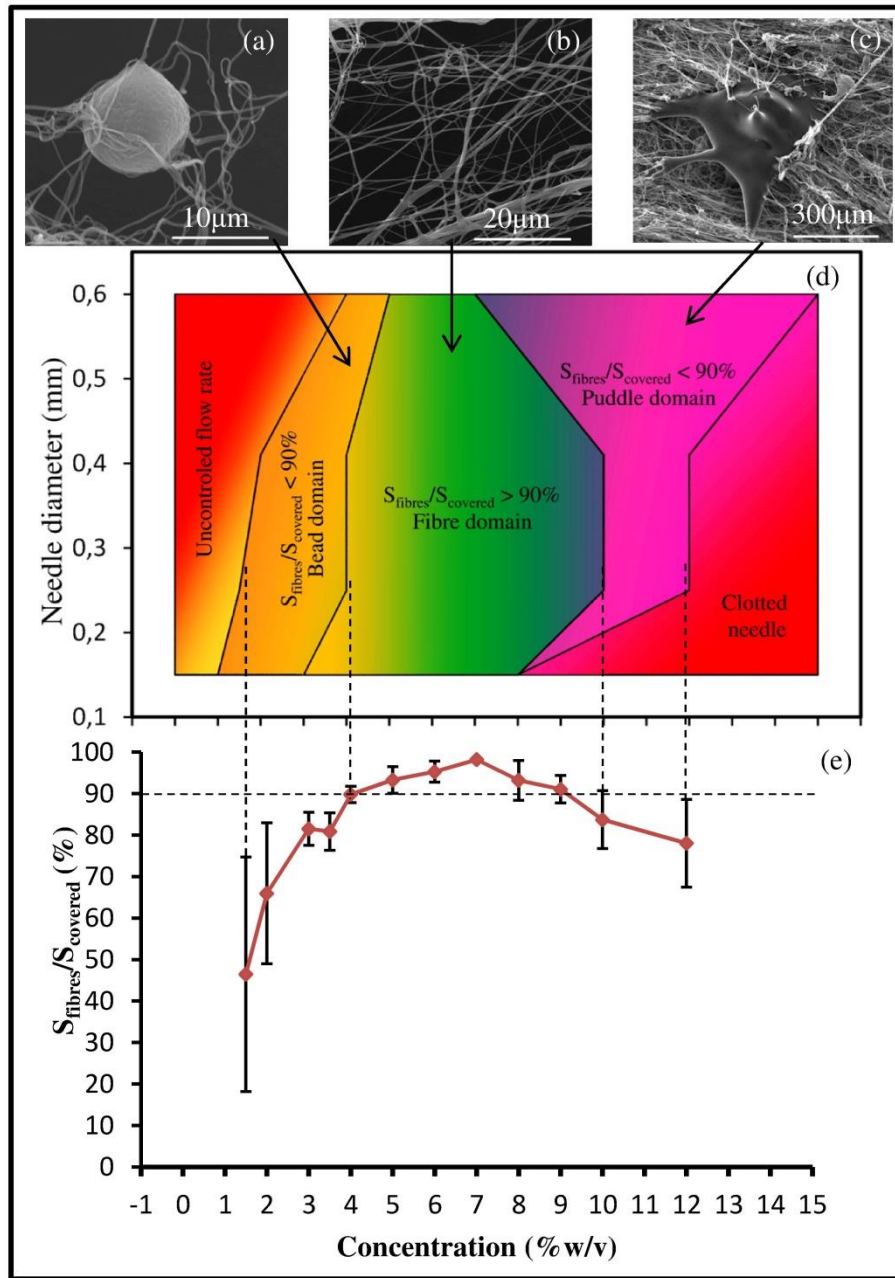


Figure 38. Air spun nanofibre scaffold morphologies. (a) bead inside the scaffold; (b) nanofibre scaffold; (c) puddle of PLA polymer; (d) functioning chart, (e) surface ratio using a 0.25 mm-diameter needle.

Figure 38e provides an example for a needle of 0.25 mm and shows the evolution of surface ratio ($S_{\text{fibres}}/S_{\text{covered}}$) of the fibres, which covered the samples, as a function of PLA concentration. As shown in this Figure, the spinnability concentration ranged between 1.5 and 12% w/v. Samples with a surface ratio up to 90% were defined as a fibre domain. In practice, this definition applies to concentrations between 4 and 10% w/v, which basically corresponds to the plateau region in Figure 38e. These samples were reproducible and uniform, as observed through the relative fibre to (bead/puddle) surface ratio ($S_{\text{fibres}}/S_{\text{covered}}$) measurement error bars. The best reproducibility result was achieved with a 7% PLA concentration, which also turned out to be the conditions at which a bead- or puddle-free fibre network was achieved. Samples with a surface ratio of less than 90% were defined as either a bead or puddle domain where these elements were more numerous. SEM observations showed that puddles did appear with higher concentrations and are presented while the surface ratio decreased with concentrations inferior to 90%.

These measurements were also performed with needle diameters of 0.6, 0.41, and 0.15 mm. Comparing these results with those presented in Figures 2a-c enabled us to determine an overall PLA fibre formation behaviour, as depicted in Figure 38d. Of interest is that fibre formation with the lowest concentration occurred at 1.5% w/v for a needle diameter of 0.15 mm, while beads only appeared at 1% w/v for this needle diameter. On one hand, solution flow was uncontrolled for the lowest concentration and highest needle diameter. On the other hand, the PLA solutions in the highest concentration range were too viscous to flow with ease through the lowest needle diameters.

Based on the data presented in Figure 38, we then focused on examining the experimental concentrations between 4 and 10% w/v with 0.41 and 0.25 mm-diameter needles, as this set of ranges produced the highest fibre-to-bead/puddle ratio.

6.2 Diameter measurements

Figure 39 presents the distribution of nanofibre diameters for $X_C = 4\%$ w/v, $X_D = 0.25$ mm, $X_P = 5$ MPa, $X_F = 10$ mL/h and $X_h = 200$ mm.

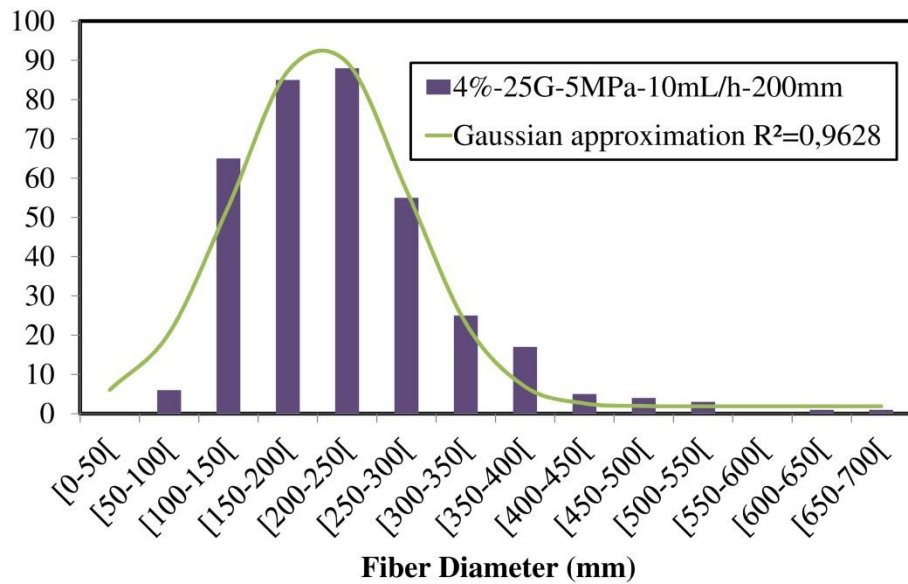


Figure 39. Typical distribution of nanofibre diameter.

In order to perform statistical analyses, the data presented in Figure 39 were fitted using a Gaussian profile [252,254,255]. As depicted in this Figure, this choice was justified by the excellent correlation coefficient between the experimental data and the fitted Gaussian curve, which greatly simplified the statistical analyses.

An identical analysis was performed for the entire set of experiments presented in Table 2 (results not shown). Correlation factors calculated from the Gaussian fit were relatively high (more than 0.7) for all of the experiments, and consequently, an average of the nanofibre diameter values could be used to estimate the Y values for the entire set of experimental designs.

6.3 Experimental designs

Three models were established from the data presented in Table 2. The first and second models were calculated from the values in Table 2a. Experiments from Table 2b were added to constitute the third model. An analysis of variance revealed a significant group effect on the nanofibre diameter for the three models (M1: $\alpha = .05$, $F(4,27) < 178$, $p < .001$;

M2 : $\alpha = .05$, $F(14,18) < 136.96$, $p < .001$; M3 : $\alpha = .05$, $F(15,25) < 73.1$, $p < .001$). Figure 39 presents the results of the least squares multiple regressions.

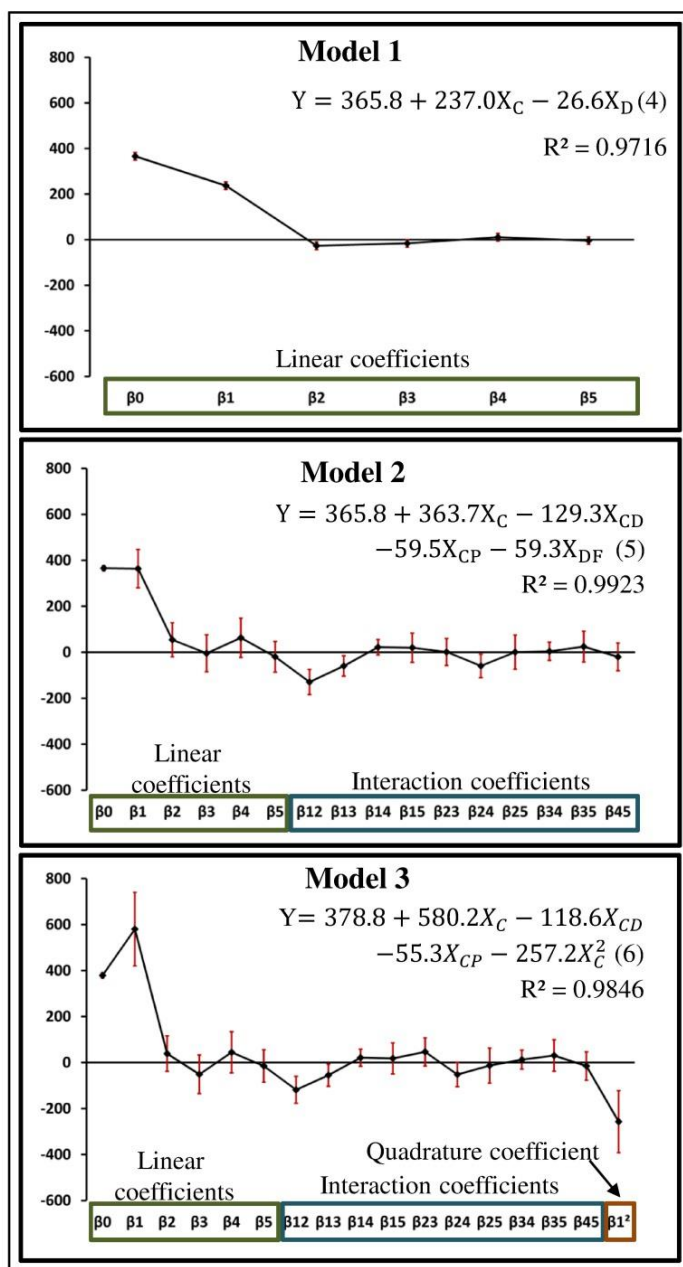


Figure 40. Confident intervals for regression coefficients and model Equations (X_C : solution concentration, X_D : needle diameter, X_F : flow rate, X_P : pressure, a X with two subscript letters shows an interaction between two parameters (e.g $X_{CD} = X_C.X_D$)).

All possible cases were calculated, from single interaction to saturated models, which enabled us to determine the more significant parameters used thereafter to build up models 1, 2, and 3.

In our initial observation, PLA solution concentration (X_C) was clearly the most significant parameter considering all three models (Equations 14, 15, and 16), and the only one to lead to an increase in nanofibre diameter (positive sign), as shown in Figure 4. Needle diameter (X_D), air pressure (X_P), and solution flow rate (X_F), although less significant, also had to be taken into account, as they appeared in interaction terms. Finally, the distance between the needle and the substrate (X_h) had clearly no effect on fibre diameter, which signifies, from a physical standpoint, that all of the solvent had evaporated during spinning for the investigated needle-to-sample distance.

Model 1 (Equation 14) served as a basis for comparison by taking into account that no interaction existed between the various investigated parameters. Accordingly, in the first approximation, this model demonstrated that polymer concentration and needle diameter were both significant parameters in controlling PLA nanofibre diameter.

Although not perfect, Model 1 allowed for the anticipation of parameters which could potentially interact with other set-up condition parameters, such as concentration, and to a lesser extent, needle diameter. Superior correlation coefficients were thus obtained in Model 2 (Equation 15) and Model 3 (Equation 16), while considering the interaction of pressure and concentration (X_{CP}), and were therefore more in line with the assumption that air pressure should somehow play a role in the air-spun PLA fibre diameter. Model 2 showed that the needle diameter parameter was significant only when considering its interaction with concentration and flow rate.

Model 3 was also constructed from first-hand information obtained from Model 1. Indeed, the singular importance of PLA concentration demonstrated in Model 1 led to the logical integration of a quadrature concentration term which was shown, however, not to bring as much precision to the model. Indeed, despite being rather high, the regression coefficient

calculated with Model 3 remained lower than that with Model 2, which confirms that the quadrature coefficient factor had little significance in terms of controlling air-spun PLA fibre diameter. Similarly, the interaction between needle diameter and flow rate became insignificant due to the addition of experimental data to build up Model 3. Thus the control of PLA nanofibre diameter through air spinning was better described by Model 2.

6.4 Viscosity results

The importance of the concentration parameter on the PLA nanofibre diameter highlighted above may be extended to a larger concentration range to further explain the so-called formation of polymer beads (at concentrations lower than that of the fibre formation concentration domain) and polymer puddles (higher than that of the fibre formation concentration domain). However, this can be more easily conceptualised by considering the polymer specific viscosity calculated in Equation 12 which is known to be concentration dependent, as is clearly evidenced in Figure 41.

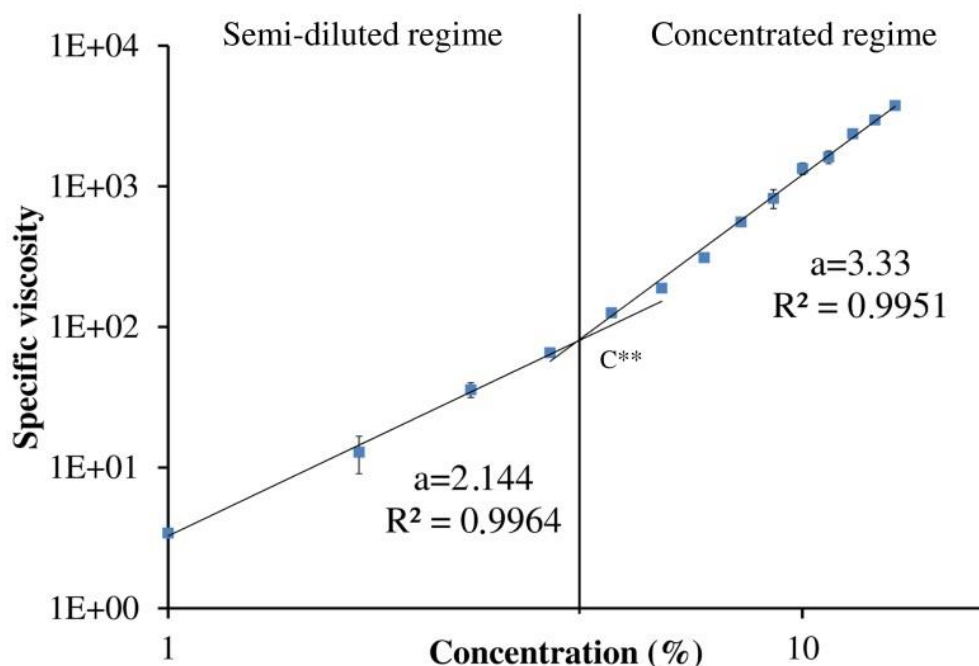


Figure 41. Specific viscosity of PLA solutions as a function of polymer concentration

Figure 41 shows two different regimes, with each one playing a key role in the extension of the polymer chains inside the solution and ultimately contributing to nanofibre formation and integrity. The first region produced concentration values between 1% w/v and C^{**} (approximately 4.3% w/v) [256–258] and thus represented the semi-dilute regime. C^{**} was the critical concentration between low-interacting polymer chains (where movements between chains were possible) and a state where the chains were totally entangled. In the semi-dilute state, the solvent surrounded the polymer chains, forming blobs and leading to few molecular interactions between the polymer molecules. In the concentrated regime, the polymer chains were significantly entangled [256]. Air spinning of PLA in the semi-dilute regime led to an elevated concentration of the so-called beads within the polymer fibre network, whereas in the concentrated regime, nanofibre formation was definitely stabilised. Of note, the curve slopes presented in Figure 40 correlate with those in previously published research [256,259].

7. Discussion

Our research group developed an alternative and innovative method for the spinning of nanofibres to coat vascular prostheses which is impossible with a conventional electrospinning device [160]. We also demonstrated the biocompatibility of PLA air-spun nanofibre scaffolds with endothelial cells [159].

In this study, optimisation of the nanofibre assembly was achieved by quantifying the quality of spinning by calculating fibre surface coverage and diameter. Our results enabled us to determine a range of concentration to produce a maximised nanofibre quality (4% w/v-10% w/v). The data show that optimum scaffold quality was achieved with approximately 7% w/v concentration using either 0.25 or 0.41 mm-diameter needles. These values are obviously difficult to directly compare with those of electrospinning because of the different stretching forces (electric fields as opposed to air flow) [260,261] and polymer solution characteristics involved [161]. It should also be emphasised that similar spinning procedures may lead to different fibre diameters and scaffold morphologies due to differences in design set-up.

As shown in Figure 38, the experimental parameter limits of the air-spun apparatus were determined to produce the most appropriate fibrous scaffold for tissue engineering applications. These limits are clearly imposed by a value of surface ratio of 90%. Moreover, SEM observations showed a drastic decrease of beads proportion with increasing viscosity and, on the contrary, the appearance of puddles and its increasing for higher concentrations (values not shown).

Beads are usually shown as a defect in the electrospun nanofibre domain due to the Rayleigh-Plateau instability [164], and have been known to have a negative influence on mechanical properties [262]. Indeed, uniform fibres lead to a continuous traction stress state. On the contrary, the presence of beads may create local traction stress concentration and ultimately lead to early failure.

As for the biological considerations, one objective in using a nanofibre scaffold is to mimic the extracellular matrix for cell adhesion and proliferation. The presence of polymer beads within the scaffold structure must therefore be minimized accordingly. Under optimal conditions (concentration 7%, needle diameter 0.25 mm), beads occupy a surface area of close to 3% of the overall fibre assembly, with minimal impact to the scaffold's mechanical properties.

To our knowledge, our study is the first to report the formation of puddles in a fibre spinning process. Our data indicate that these features are likely due to instabilities (different from those responsible for bead formation) and occur at high polymer solution concentrations (greater than 9-10% w/v with a needle diameter of 0.25 mm). In electrospinning, high polymer concentrations result in the disappearance of beads [263], contrary to what is observed in air spinning in which high polymer concentration solutions are apparently too viscous to be stretched by high speed air flow, thereby preventing efficient solvent evaporation and impeding nanofibre formation. A solution to this problem may be to considerably increase air pressure which, however, may cause deleterious fibre failure and subsequent early degradation upon utilisation as a biological scaffold [159].

Moreover, the aforementioned puddles formed at high polymer concentrations are likely to contain residual solvent which may ultimately be toxic for cells.

The parameters presented in Table 2 are typically chosen in research [161,255,258,263,264] to study spinning devices and are known to have a significant effect on fibre morphology. Within the parameter ranges, the spun fibres had a diameter close to 100 nm. Consequently, nanofibre scaffolds produced in this range of parameters will not only bridge the dimensional mismatch between PET textile microfibres or microporous ePTFE structures of vascular prostheses and endothelial cell dimensions [158,159], but also lead to monolayer cell proliferation. Our prototype therefore meets the requirements of matching the mechanical properties of PET vascular prostheses while adapting endothelial cell proliferation in a monolayer.

The biodegradable nature of PLA must also be taken into account in the design of a scaffold for biomedical applications. During completion of the cell adhesion, proliferation confluence, and maturation processes, it is expected that the nanofibre scaffold be progressively replaced by the natural extracellular matrix [265]. Consequently, intrinsic material properties and scaffold morphology must be controlled to hone the PLA degradation kinetics. Indeed, fibre diameter has direct consequences on degradation rate [266]. In this regard, determining nanofibre diameter also provides additional information on the degradation control mechanism related to scaffold morphology.

Robust multilinear regression models were used to describe nanofibre diameter distribution as a function of the air spinning experimental parameters. Although Model 1 (no interaction between parameters) was shown to produce less accurate information, it did, however, provide a better understanding of parameter significance and interaction origin. From this model, PLA solution concentration was clearly shown to be the most significant parameter in controlling nanofibre diameter. This first-hand information also enabled us to construct more precise models that considered giving greater importance to the concentration parameter (Model 3) or to the interactions between polymer solution concentration and other spinning parameters (Model 2).

Model 2 provided us with the best correlation coefficient, therefore highlighting the overall importance of controlling each and every parameter of the spinning procedure. Moreover, it supports the assumption that some driving forces related to the interactions between such experimental parameters as polymer solution concentration, needle diameter, air pressure, and polymer solution flow rate, may influence the spinning process. For example, the interaction between PLA solution concentration and needle diameter (X_{CD}) was directly linked to the surface tension of the drop at the needle tip [265,267,268] and therefore controlled the drop size and the quantity of solution which was instantaneously stretched. Similarly, mechanical forces deployed to stretch the fibres were related to the interaction between PLA concentration and air pressure (X_{CP}). This is in agreement with the results presented in Figures 39a-c which showed that high-viscosity polymer solutions were harder to stretch.

PLA solution concentration is the most difficult parameter to ascertain. In fact, this study demonstrates that it is the viscosity of the polymer solution (which in turn depends on such parameters as stereochemistry [261], copolymerization [265], molecular weight [269], and concentration) which must be taken into account to control fibre diameter and scaffold morphology. In this context, the polymer solution concentration must only be considered as an indicator of the more global parameter, namely, viscosity. Figure 41 shows two different dilution regimes depending on the concentration. These results correlate with those presented in Figures 38 and 39 which show three spinning domains. Essentially, bead domain ($S_{\text{fibres}}/S_{\text{covered}} < 90\%$) was observed in the semi-dilute regime while fibre domain was observed in the concentrated regime ($S_{\text{fibres}}/S_{\text{covered}} > 90\%$). When polymer concentration increased above 10%w/v, (needle diameter 0.25 mm), the solution viscosity was simply too high to stretch the polymer assembly. This confirms that the precise location of the borders between domains is needle diameter-dependent.

These results demonstrate that low-viscosity polymer solutions lead to the occurrence of bead formation [270,271]. This can be explained by the fact that some polymer molecules in the semi-dilute regime were isolated, resulting in bead formation, while others were more entangled, which ultimately promoted fibre network development. In the concentrated

regime, the polymer chains were highly entangled which, along with experimental parameters such as the small needle diameter of the injector and the relative low air pressure, promoted further contact between the polymer chains. This interpretation has been shown to theoretically predict the fibre [272].

Overall, fibre scaffold formation by the air spinning method is somewhat similar to that produced by electrospinning in terms of its polymer solution viscosity dependence, which therefore signifies that both spinning techniques require polymers with molecular weights that are high enough to attain the concentrated domain.

8. Conclusion

In this study, we optimised the experimental parameters of an innovative spinning process developed to coat vascular prostheses with a PLA scaffold to promote endothelial cell adhesion and proliferation. Bead, fibre, and puddle domains were evident for various needle diameters and polymer concentrations. Our data demonstrate that an optimal fibre scaffold is achievable with a polymer concentration of approximately 7% w/v and a needle diameter of 0.25 mm. Multilinear regression was performed to develop models to establish the relationship between fibre diameter and the various spinning parameters and confirms the paramount importance of the polymer solution concentration. Viscosity measurements were also conducted to highlight the physical aspects of fibre formation.

9. Acknowledgements

This work was supported by Region Alsace, Centre Québécois sur les Matériaux Fonctionnels (CQMF), and the National Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada. The authors wish to acknowledge André Ferland from the Department of Mining, Metallurgical and Materials Engineering at Université Laval and Yann Giroux from the Department of Chemical Engineering at Université Laval.

10. Supplementary data

Table 3: Informations supplémentaires du chapitre IV : correlation coefficients on average nanofiber diameter calculation (Y)

Exp.	X _C	X _D	X _P	X _F	X _h	Y (nm)	R ²
1	10%	0,41mm	5 MPa	10 ml/h	200 mm	588	.8317
2	10%	0,41mm	10 MPa	10 ml/h	200 mm	476	.9552
3	10%	0,41mm	10 MPa	50 ml/h	200 mm	503	.8835
4	10%	0,41mm	5 MPa	50 ml/h	200 mm	602	.7007
5	10%	0,41mm	5 MPa	50 ml/h	300 mm	518	.7573
6	10%	0,41mm	10 MPa	50 ml/h	300 mm	539	.9057
7	10%	0,41mm	10 MPa	10 ml/h	300 mm	535	.7412
8	10%	0,41mm	5 MPa	10 ml/h	300 mm	612	.9267
9	4%	0,25mm	5 MPa	10 ml/h	300 mm	125	.9813
10	4%	0,25mm	10 MPa	10 ml/h	300 mm	131	.9603
11	4%	0,25mm	10 MPa	50 ml/h	300 mm	129	.9691
12	4%	0,25mm	5 MPa	50 ml/h	300 mm	134	.9765
13	4%	0,25mm	5 MPa	50 ml/h	200 mm	167	.9853
14	4%	0,25mm	10 MPa	50 ml/h	200 mm	120	.9574
15	4%	0,25mm	10 MPa	10 ml/h	200 mm	134	.945
16	4%	0,25mm	5 MPa	10 ml/h	200 mm	120	.8368
17	10%	0,25mm	10 MPa	10 ml/h	200 mm	598	.8368
18	10%	0,25mm	5 MPa	10 ml/h	200 mm	642	.8062
19	10%	0,25mm	5 MPa	50 ml/h	200 mm	724	.914
20	10%	0,25mm	10 MPa	50 ml/h	200 mm	666	.8269
21	10%	0,25mm	5 MPa	50 ml/h	300 mm	716	.7887
22	10%	0,25mm	10 MPa	50 ml/h	300 mm	669	.828
23	10%	0,25mm	10 MPa	10 ml/h	300 mm	559	.908
24	10%	0,25mm	5 MPa	10 ml/h	300 mm	639	.8152
25	4%	0,41mm	5 MPa	10 ml/h	200 mm	127	.9605
26	4%	0,41mm	10 MPa	10 ml/h	200 mm	161	.8325
27	4%	0,41mm	10 MPa	50 ml/h	200 mm	141	.8983
28	4%	0,41mm	5 MPa	50 ml/h	200 mm	152	.9591
29	4%	0,41mm	5 MPa	50 ml/h	300 mm	118	.9847
30	4%	0,41mm	10 MPa	50 ml/h	300 mm	125	.8856
31	4%	0,41mm	10 MPa	10 ml/h	300 mm	110	.9904
32	4%	0,41mm	5 MPa	10 ml/h	300 mm	127	.9546
33	7%	0,25mm	5 MPa	50 ml/h	200 mm	524	.9686
34	7%	0,41mm	5 MPa	50 ml/h	200 mm	385	.8301
35	7%	0,25mm	5 MPa	10 ml/h	200 mm	505	.9179
36	7%	0,41mm	5 MPa	10 ml/h	200 mm	418	.847
37	7%	0,25mm	10 MPa	50 ml/h	200 mm	394	.9673
38	7%	0,41mm	10 MPa	50 ml/h	200 mm	458	.8738
39	7%	0,25mm	10 MPa	10 ml/h	200 mm	353	.9604
40	7%	0,41mm	10 MPa	10 ml/h	200 mm	408	.9199

Chapitre V. Conception, mécanisme de dégradation et cytotoxicité à long terme de films et de nanofibres filées par jet d'air de poly(L-lactide) et de poly(L-lactide-co-ε-caprolactone)

Design, degradation mechanism and long-term cytotoxicity of poly(L-lactide) and poly(lactide-co-ε-caprolactone) terpolymer film and air-spun nanofiber scaffold

Gad Sabbatier ^{1,2,3}, Aitor Larrañaga ⁴, Andrée-Anne Guay-Bégin ², Jorge Fernandez ⁴,
Florence Diéval ³, Bernard Durand ³, Jose-Ramon Sarasua ⁴, Gaétan Laroche ^{1,2*}

² Laboratoire d'Ingénierie de Surface, Centre de Recherche sur les Matériaux Avancés, Département de génie des mines, de la métallurgie et des matériaux, Université Laval, Québec (QC), G1V 0A6, Canada.

² Axe Médecine Régénératrice, Centre de recherche du CHU de Québec, G1L 3L5, Canada

³ Laboratoire de Physique et Mécanique Textile, Université de Haute Alsace, École Nationale Supérieure d'Ingénieurs du Sud Alsace, 68093 Mulhouse cedex, France

⁴ University of the Basque Country (UPV/EHU), Department of Mining-Metallurgy Engineering and Materials Science, School of Engineering, 48013 Bilbao, Spain.

Published in Macromolecular Bioscience

June 2015

* Corresponding Author : Gaétan Laroche, Laboratoire d'Ingénierie de Surface, Centre de recherche du CHU de Québec, Hôpital St-François d'Assise, 10 rue de l'Espinay, Québec G1L 3L5 Québec, Canada. E-mail : gaetan.laroche@gmn.ulaval.ca

1. Résumé

Les échafaudages de polymères dégradables sont connus pour fournir une structure temporaire, polyvalente et appropriée pour la régénération tissulaire. Néanmoins l'échafaudage de nanofibres doit être conçu convenablement et démontrer une réponse biologique appropriée pendant le processus de dégradation. Dans ce contexte, cette publication se concentre sur la conception d'un terpolymère d'acide poly(lactique-co- ϵ -caprolactone) (PLCL) spécifique qui pourrait être en accord avec les besoins pour des applications dans les biomatériaux vasculaires et sur sa comparaison avec un acide poly(L-lactique) semi-cristallin, bien connu dans ce domaine. Les mécanismes de dégradation des films et des nanofibres filées par jet d'air de ces polymères et le comportement des cellules endothéliales ensemencé avec les produits de dégradation ont été mis en évidence. Les résultats montrent les bénéfices d'utiliser le terpolymère de PLCL en tant que biomatériau vasculaire, plutôt que le PLLA.

2. Abstract

Degradable nanofiber scaffold is known to provide a suitable, versatile and temporary structure for tissue regeneration. However, synthetic nanofiber scaffold must be properly designed to display appropriate tissue response during the degradation process. In this context, this publication focuses on the design of a finely-tuned poly(lactide-co- ϵ -caprolactone) terpolymer (PLCL) that may be appropriate for vascular biomaterials applications and its comparison with well-known semi-crystalline poly(L-lactide) (PLLA). The degradation mechanism of polymer film and nanofiber scaffold and endothelial cells behavior cultured with degradation products is elucidated. The results highlight the benefits of using PLCL terpolymer as vascular biomaterial compared to PLLA.

3. Highlights

Innovative degradable terpolymer nanofiber scaffold with finely tuned features lead to a better long-term interaction with specific cells than usual degradable biomaterial. This family of polymer can be used for degradable medical devices and has been applied as vascular biomaterial. Moreover, this article brings substantial new information in general aspects of biodegradable scaffold.

Keywords: Nanofibers, polylactide, poly(lactide-co- ϵ -caprolactone), degradation, tissue engineering, vascular biomaterials.

4. Graphical abstract

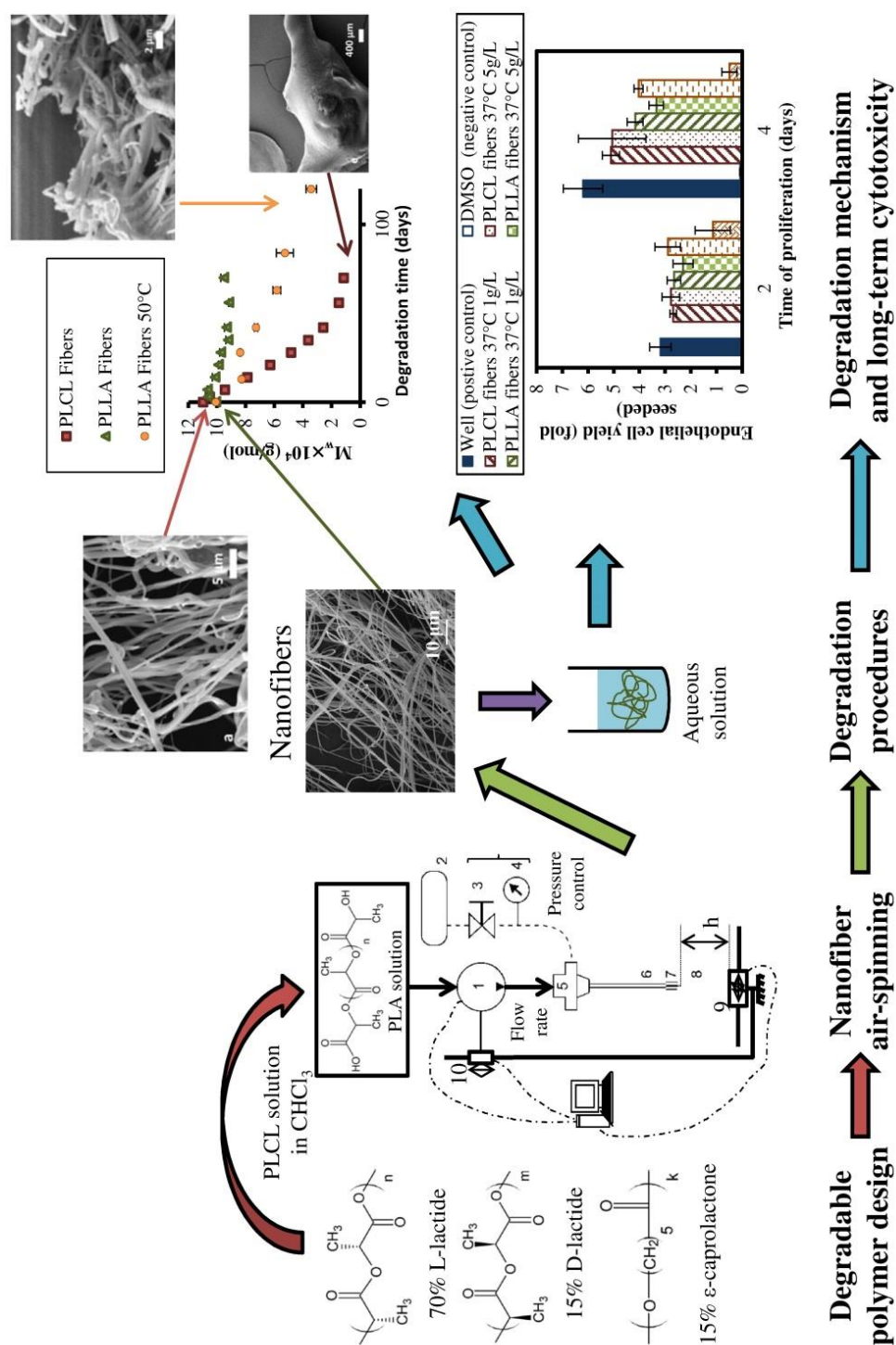


Figure 42. Résumé graphique du chapitre V

5. Introduction

Vascular diseases continue to be one of the leading causes of death worldwide [273]. The autologous blood vessel remains the best option to replace coronary and peripheral arteries, but is often unsuitable or simply unavailable. Accordingly, in the most serious cases of vascular diseases, surgeons have no choice but to replace arteries with synthetic vascular prostheses. Despite the relative successfulness of woven and knitted polyethylene terephthalate (PET) and expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) prostheses for the replacement of larger diameter arteries ($\varnothing > 6$ mm), synthetic prostheses fail for smaller diameters ($\varnothing < 6$ mm) upon implantation in humans, because the polymeric materials exhibit a thrombogenic luminal surface leading to re-stenosis [77]. Until now, providing long-term patency small diameter vascular substitutes remains the foremost challenge in vascular surgery [50].

The current approach to improve the patency of synthetic prostheses is to regenerate a functional neo-intima on their luminal wall, therefore providing a non-thrombogenic surface between blood and prosthesis material, as observed in the native vasculature. That said, the prosthesis structure constitutes a non-suitable surface for endothelial cells (EC) monolayer proliferation due to a dimensional mismatch between the EC size and the prosthesis structure scale [158]. Consequently, covering the surface of prostheses with a nanofiber scaffold was proposed to eliminate this geometrical discordance, and allow EC proliferation as monolayer. Indeed, previous studies demonstrated that nanofiber scaffolds somewhat match the extracellular matrix fiber dimension and provide a suitable environment for cell adhesion and proliferation [159]. Nanofiber scaffold is also commonly used as the initial step for constructing a tissue-engineered blood vessel. This strategy consists of producing a spun nanofiber scaffold on a mandrel to build up a tube, which is then seeded by smooth muscle cells to regenerate the media layer, which is, in turn, cultured with endothelial cells on its internal side to reproduce the endothelium, and with fibroblasts on its external side, to get the adventitia [50]. The aforementioned approaches for generating new vascular substitutes imply the design of a spinning apparatus able to

produce tubular nanofiber scaffolds as well as to coat tubular constructs with nanofiber meshes.

Most of the time, nanofiber technology is associated to the electrospinning process which has been extensively described in the tissue engineering and regenerative medicine literature in the last decades [161,274–276]. This common and easy route of producing nanofibers is based on the stretching of a polymer, either in solution or melted, with an electrostatic force, and enables forming uniaxially shaped objects such as ribbons [277], core-shell fibers [278], composite fibers, or nanotubes [279]. These constructs can be also aligned in one or several directions as sheets or tubes according to the geometry of the collector [161,280]. In biomedical applications, electrospun nanofiber constructs find applications in bone and cartilage regeneration [281], skin regenerative medicine [282], or cardiac tissue engineering [283]. They also enable embedding bioactive molecules to mimic biological environments [284] or controlling stem cell differentiation [285,286]. Although, the electrospinning process presents significant advantages, it cannot be easily used to coat small diameter vascular prostheses because of the short distance separating the needle and the surface that is intended to receive the fibers and the discontinuous textile shape of the vascular prosthesis which impedes building-up appropriate electrostatic field gradient, full jet development and solvent evaporation. To address to this issue, an alternative spinning device, called air-spinning, has been introduced by our group [159] and is continuously improved [160,287] since 2008 to coat the internal surface of vascular prostheses.

Degradable nanofiber scaffold aims to provide biomimetic morphology and a temporary support to adhesion and proliferation of cells. After the production of cell extracellular matrix and the formation of functional tissues, the scaffold is no more required and must degrade. Thus, choosing the right biomaterial with appropriate elastic properties and finely-tuned surface and degradation features is another crucial consideration for providing a biomimetic scaffold with appropriate functionalities over a predetermined period of time. In addition, the material has to be biodegradable to enable a graduate replacement by the EC extracellular matrix which is a challenge in vascular biomaterial field as well as almost every regenerative medicine strategies. Poly(α -hydroxy acid) polymers were the first

biodegradable biomaterials to be implanted in humans [288]. In 1971, poly(lactide) (PLA) suture threads were approved by the Food and Drug Association (FDA). Over the years, this material was gradually replaced by poly(lactide-co-glycolide), due to its higher hydrophilic character and faster degradation rates [289]. Since then, these materials were widely developed and used as biomedical devices because of the possibility to tune their biodegradation and mechanical properties. Indeed, these polymers are now currently used to fabricate orthopedic devices such as screws, pins, and rods, plates, and microspheres for maxillofacial surgery and drug delivery system [288]. Recently, a covalent-grafting and release model of molecules directly from PLA-based nanofiber surface was developed and demonstrated to be a promising avenue to offer suitable bioactive scaffold characteristics [290]. In vascular surgery, poly(L-lactide) (PLLA) has also been recently manufactured and marketed as bioresorbable drug-eluting stent [291]. It is possible to control the degradation rate of PLA by blending appropriate amount of this polymer stereoisomers that are PLLA, poly(D-lactic acid) (PDLA) and poly(DL-lactic acid) (PDLLA) [237]. Additionally, copolymerization between l-lactide and ϵ -caprolactone units was commonly used to increase the elasticity of PLA while controlling degradation rate [292]. However, the degradation of PLA blends or poly(l-lactide-co- ϵ -caprolactone) could evolve toward crystalline residues which are likely to remain for a long time in the body [187] and provoke immune reaction [188,293] due to an acidic degradation. A better alternative polymer was found to be a poly(lactide-co- ϵ -caprolactone) terpolymer (PLCL) synthesized from the copolymerization of L-lactide, DL-lactide and ϵ -caprolactone monomers. This novel sub-family of PLA-based materials demonstrated appropriate degradation properties for cardiovascular applications [294]. Depending on the ratio of monomers and the polymer molecular weight, the degradation rate can be modulated from some days to some months. The presence of ϵ -caprolactone provides the increase of the elastic properties required for cardiovascular biomaterials as compared to classical PLA blends while showing a little or even no crystalline remnants after the degradation process. Finally, this new generation of PLCL was patented in 2014 [295] and has never been spun and never studied as fibrous material.

In this context, this study aims to producing PLCL nanofiber scaffolds and studying their degradation rate and mechanisms. During all the study, PLCL was compared to semi-crystalline PLLA films and fibers in terms of degradation rate and long-term cytotoxicity. Finally, adhesion and expansion of EC were performed in contact with these materials formed as films or nanofibers and their degradation products. These experiments allowed us to ascertain the potential of PLCL to be used as vascular biomaterial and provided new information about its cytotoxicity as a function of the polymer degradation time.

6. Experimental section

6.1 Materials synthesis

PLCL consisted of a statistical polymer containing 50 wt% of L-lactide, 35 wt% of D,L-lactide (>99.5%, Purac Biochem BV, Gorinchem, The Netherlands) and 15 wt% of ϵ -caprolactone (>98%, Merck KGaA, Damstadt, Germany) while poly(L-lactide) (PLLA) was a classical linear chain of L-lactide conformers. Both polymers were synthesized through ring-opening polymerization process, as described elsewhere [3,296]. The reaction was catalyzed by bismuth (III) subsalicylate (BiSS, 99.9% trace metals basis, Sigma Aldrich, 1500: 1 comonomers: catalyst molar ratio) during 24 h at 130 °C.

6.2 Films and nanofibers

PLCL and PLLA films were processed by compression molding in a Collins P200E hydraulic press (at 210 °C and 24 MPa for PLLA films and at 180 °C and 24 MPa for PLCL films) to obtain squared films (11 × 12 cm²). Films were then quenched in water in order to promote the formation of an amorphous state. Finally, PLLA films were crystallized during 100 min at 120 °C in an oven to reach a crystallinity degree equivalent to the PLLA polymer before film processing. Each film was washed two times in water in ultrasonic bath for 10 min each.

Polytetrafluoroethylene (PTFE) films were obtained from Goodfellow (Coraopolis, PA, USA) and used as negative control in cells culture assays. PTFE films were punched with

an 8 mm-diameter pastry cutter and sequentially washed for 10 min in acetone, water and ethanol in an ultrasonic bath bath to remove impurities and stored in vacuum at least 72 h..

PLCL and PLLA were also totally dissolved in chloroform (99.8%, Laboratoire Mat, Québec, QC, Canada) at room temperature and spun with an air-spinning device previously described elsewhere [287]. An optimal polymer concentration of 14 wt% was calculated from the viscosity of the polymer solution for both PLCL and PLLA and, accordingly, the needle diameter (0.41 mm), syringe pump flow rate (10 mL.h⁻¹), air pressure (7.5 MPa) and needle-collector distance (250 mm) were set. Nanofibers were then stored under vacuum at least 72 h to remove all trace of solvent.

6.3 Polymer degradation procedures

For the *in vitro* degradation study, PLCL and PLLA square samples (1 cm²) taken from films and air-spun nanofibers (groups 1-8 in Table 4, n = 3) were weighted (W_0) and totally immersed in Falcon tubes containing a phosphate buffered saline (PBS) (pH = 7.4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) solution. The volume was adjusted to get a mass to volume ratio of 1 g.L⁻¹. Each sample was placed in an oven at 37 °C during 70 days.

Accelerated degradation studies were also performed on PLLA film and fiber samples (groups 7 and 8 in Table 4, n = 3) in order to obtain the same degradation rate between PLCL at 37 °C and 70 days of degradation and PLLA to provide a better comparison between the two materials. Conditions of accelerated degradation applied to PLLA were determined from models described by Weir *et al.* [297]. Accordingly, PLLA fiber and film samples were kept in PBS at 50°C during 120 days with mass to volume ratio of 1 g.L⁻¹.

For studying EC behavior while seeded on materials submitted to the aforementioned degradation procedures, degradation process was performed in autoclaved distilled water with the same groups of samples (groups 1-8 in Table 4, 37 and 50°C, n = 3). Water was used instead of PBS as degradation medium to preserve an appropriate osmolarity for cell culture medium. Film samples were punched (8 mm-diameter) with a pastry cutter before degradation to match the well dimension of 48-well plates. The sample weight to liquid

volume ratio was adjusted at 1 1 g.L⁻¹ and at 5 1 g.L⁻¹ to assess the effect of degradation product concentration on cell survival (groups 9 to 14 in Table 4, n = 3).

Table 4: List of sample groups

Sample groups	Material	Shape	Degradation temperature (°C)
1	PLCL	film	No degradation
2	PLCL	Fibers	No degradation
3	PLLA	film	No degradation
4	PLLA	Fibers	No degradation
5	PLCL	film	37
6	PLCL	Fibers	37
7	PLLA	film	37, 50
8	PLLA	Fibers	37, 50
9*	PLCL	Film degradation product 1 g/L	37
10*	PLCL	Fiber degradation product 1 g/L	37
11*	PLCL	Fiber degradation product 5 g/L	37
12*	PLLA	Film degradation product 1 g/L	37, 50
13*	PLLA	Fiber degradation product 1 g/L	37, 50
14*	PLLA	Fiber degradation product 5 g/L	37, 50

* Samples of these groups consist of water containing degradation products.

6.4 Molecular characterization of synthesized PLCL

The characterization of PLCL after synthesis is described in the supporting information and was detailed in a previous publication [298]. Briefly, the molecular structure of PLCL was determined from proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) spectra recorded with a

Bruker Avance DPX 300 (Billerica, MA, USA) at 300 MHz using 5 mm diameter sample tubes. Peaks at 5.15 and 4.1 ppm, assigned to methine of lactide and methylene of ϵ -caprolactone, respectively, allowed the statistical calculation of ratios related to different polymer conformation (Figure 51). Lactide and ϵ -caprolactone relative molar contents were determined from the ratio of the aforementioned integrated intensities. From these values, the number-average sequence lengths of lactide (l_{LA}), L-lactide (l_{L-LA}), D-lactide (l_{D-LA}), and ϵ -caprolactone (l_{CL}) units and the randomness character (R) were calculated according to previously published procedure [3] detailed in supporting information.

6.5 Characterization of polymer films before degradation

Tensile testing was performed on PLCL and PLLA films after processing. Tensile mechanical properties were determined with an Instron 5565 dynamometer (Instron, Norwood, MA, USA) at a crosshead speed of 10 mm.min⁻¹. These experiments were performed according to the ISO 527-3/1995 standard procedure at both room temperature (21 ± 2°C) and 37 °C. For the experiments made on PLCL films at 37 °C, the elastic modulus was calculated from the strain at 10 % using a secant at 2 % strain since no yield point was observed in the stress-strain plot. In addition, the tensile strength was measured after 300 % of strain, which corresponds to the maximum distance physically achievable between the clamps at 37 °C. For all other samples, the elastic modulus was considered as a Young's modulus (PLLA) or a secant modulus at 2 % (PLCL), while the tensile strength was determined after sample failure.

The thickness of PLCL and PLLA films was determined before degradation using a profilometer (DektakXT Advanced system, Bruker) equipped with a 12.5 µm tip. A force of 3 mN was applied from the tip to the surface. The acquisition lasted 60 s on a distance of 500 µm.

Contact angle measurements were performed on film samples using a VCA 2500 XE system (AST, Billerica, MA, USA). Three 3 µL drops of distilled water were set down on film surfaces and the contact angle was calculated with VCA Optima software.

6.6 Physical and chemical characterization during degradation

At different periods of time, samples ($n = 3$) of each *in vitro* degradation group of samples were removed from the PBS and weighed wet (W_w) after wiping the surface with a filter paper to adsorb the excess of water. These samples were air-dried overnight and then vacuum-dried for 24 h. They were weighed again to obtain the dry weight (W_d). Water absorption (%WA) and remaining weight (%RW) were calculated according to Equations 17 and 18.

$$\%WA = \frac{W_w - W_d}{W_d} \times 100 \quad (\text{Eq. 17})$$

$$\%RW = \frac{W_d}{W_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 18})$$

The molecular weight evolution of the samples during hydrolytic degradation was determined by GPC using a Waters 1515 GPC apparatus (Milford, MA, USA) equipped with two Styragel columns with pore size ranging from 10^2 to 10^4 Å. Chloroform was used as an eluent at a flow rate of 1 mL min^{-1} while polystyrene standards (Shodex Standards, SM-105) were used to obtain a calibration curve (Figure 52).

The thermal properties were determined on a DSC 2920 (TA Instruments, New Castle, DE, USA). Samples of 5-10 mg were heated at $20 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$ from $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ to $210 \text{ }^\circ\text{C}$ for PLLA samples and from $-85 \text{ }^\circ\text{C}$ to $185 \text{ }^\circ\text{C}$ for PLCL samples. This first scan was used to determine the melting temperature (T_m), the heat of relaxation (ΔH_r), the heat of crystallization (ΔH_c) and the heat of fusion (ΔH_m) of the samples. After this first scan, the samples were quenched in the DSC at the input beginning temperature and a second scan was performed using the same heating conditions. The data from this second scan were used to measure the glass transition temperatures (T_g), which was determined from the inflection point of the heat flow curve. Then, the crystallinity degree (χ) of semi-crystalline samples was calculated according to Equation 19:

$$\chi = \frac{\Delta H_m - \Delta H_c}{\Delta H_m^0} \times 100 \quad (\text{Eq. 19})$$

where $\Delta H_m^0 = 106 \text{ J/g}$ [299] is the melting enthalpy for a 100% crystalline PLLA sample.

The samples were then gold-coated and observed under a scanning electron microscope (EVO® 50, Carl Zeiss, Göttingen, Germany) (SEM) equipped with an Everhart-Thornley secondary electron detector at a 10 kV accelerating voltage. Images were analyzed with image treatment software (Image J, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Fiber diameter of PLLA and PLCL fibrous samples were measured on images with a magnitude of 10000 or 15000. A total of approximately 120 fiber diameter measurements were randomly made for PLCL fibrous sample before and after 3 days of degradation and 150 fiber diameter measurements for PLLA nanofibers before and after 35, 70 and, and 120 days of degradation, either at 37°C and 50°C. Fiber diameter distribution was normalized and fitted with three parameter lognormal function (Equation 29) using Sigma Plot software (Sigma Plot 11.0, Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

$$y = \frac{k}{x - x_0} e^{-\left(\frac{\ln(x-x_0) - \ln(\mu)}{2 \ln(\sigma)}\right)^2} \quad (\text{Eq. 20})$$

In this Equation, k is the proportionality constant, x_0 is the shift parameter, μ is the geometrical mean of the fiber diameter, and σ is the geometrical standard deviation, called shape parameter.

The progression of the mode, which is the fiber diameter value corresponding to the maximum of the lognormal curve, provided dimensional information about the degradation mechanisms. For instance, a decrease of the mode of the lognormal curve means that fiber diameter decreases upon degradation while an increase of this parameter rather signifies that fiber diameter gets higher under the influence of degradation mechanisms such as scaffold shrinkage or fiber diameter inflation. The shape parameter, which describes the curve asymmetry, highlights the low or high diameter fibers that are more affected by the degradation process. A shape parameter value close to 1 is characteristic of a Gaussian

curve, meaning that the fiber diameter population is equally distributed around the mode (which is also the mean in the case of a symmetric distribution).

6.7 HSVEC isolation and culture

HSVECs were isolated from healthy human saphenous vein segments removed during varicose vein stripping surgeries as previously described [129]. All procedures were approved by the CHU de Québec ethics committee and with the informed consent of donors at the Saint-François d'Assise Hospital in Québec city. After isolation, cells were frozen in 90 % fetal bovine serum (FBS) and 10 % dimethyl sulfoxide (DMSO). For all experiments, HSVECs were thawed after passage 2 and maintained in tissue culture treated t-flasks (Corning, NY, USA) in complete culture medium. The complete culture medium consisted of M199 medium (M199 powder, Life technologies, Burlington, ON, Canada) supplemented with 20 % of FBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), 50 U.mL⁻¹ heparin, 10 ng.mL⁻¹ basic fibroblast growth factor (bFGF, amino acids 10-155), 100 units/mL penicillin and 100 µg.mL⁻¹ streptomycin (all from Life Technologies).

6.8 Preparation of samples for HSVEC seeding, sanitization and pH measurements

Samples from group 1-4 (Table 4) and PTFE films were positioned in wells of standard tissue culture 48-well plates (Corning) with 0.4 cm² homemade sterile glass culture cylinders and immersed in sterile distilled water containing 500 U.mL⁻¹ of penicillin and 500 µg.mL⁻¹ of streptomycin for 24 h to prevent bacterial formation. Finally, samples were washed two times with sterile distilled water and dried under sterile conditions overnight at room temperature.

Procedures to avoid bacterial formation were validated with bacterial and fungus culture experiments. Each group of samples was sanitized using the aforementioned method and immersed in complete culture medium for 2 days. A blank well was used as control. Then, 10 µL of the medium was taken from each sample and spread on a Petri dish covered with

agarose. Finally, Petri dishes were incubated during 8 days and observed after experiments (Figure 53).

Water containing degradation residues (group 9- 14 in Table 4) were stored at 4 °C and sterilized by autoclaving at 121 °C during 45 min. The pH of these samples was then measured with a pH meter (Accumet™ 25, Fisher Scientific, Canada) at room temperature. Also, the measurement was repeated after mixing the liquid samples with two-time concentrated M199 solution at a 1:1 ratio. Sterile water and one-time concentrated M199 were used as control.

6.9 HSVECs adhesion and proliferation experiments in function of degradation

For adhesion and expansion experiments before degradation, control samples consisted of a blank polypropylene (PP) wells treated for cell culture (positive) and PTFE films (negative), which is anti-adhesive due to its hydrophobicity. Moreover, a well was treated with gelatine during 20 min to be used as second positive control sample in adhesion assays. Samples were seeded with 75 000 cells.cm⁻² (adhesion tests) or 20 000 cells.cm⁻² (proliferation tests) HSVECs in complete medium and were incubated at 37 °C with 5 % of carbon dioxide (CO₂) for 1 h and a half or for 48 h and 96 h, respectively. For sample groups from 9 to 14, complete medium with two-time concentrated M199 was prepared and mixed with an appropriate volume of water-containing degradation products. In this case, another negative control (cytotoxic medium) consisted of mixing two-time concentrated M199 with DMSO instead of water was prepared. After the incubation, medium was pumped and samples were rinsed two times with PBS. Then, 500 µL of 90% M199 medium and 10 % resazurin (Life Technologies) solution at 250 µg.mL⁻¹ was poured on the samples. After 3 h of incubation, 300 µL of the culture media was taken from each well and transferred in another well plate for further fluorescence measurements. A spectrofluorometer (FL600 fluorescent microplate reader, Bio Tek, Winooski, VT, USA), equipped with 530 nm excitation source and an 590 nm emission output filter was used to record the fluorescence emission intensity of resorufin resulting from the metabolization of resazurin

by cells. The fluorescence level was then compared with a calibration curve in the same well plate. This calibration curve was performed by measuring the emission level of resorufin with different level of dilution. Moreover, the noise of measurement was subtracted from the fluorescence signal by quantifying the emission level of a blank well containing a rezasurin solution (90 % M199 medium and 10 % rezasurin solution at 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). The data consisted of the mean of 9 measurements recorded at different locations in the well. The adhesion results were normalized to the blank-well positive control and the expansion results to initial number of adhered cell in a blank PS well at 20 000 cells.cm^{-2} . Each experiment was made triplicate.

7. Results

7.1 Initial characterization of PLCL and PLLA

The global and micro structure of the synthesized polymers (PLLA and PLCL) [3] as well as their general mechanical and thermal properties were characterized and are presented in Table 5.

Table 5: Characteristics of PLLA and PLCL

	Features		PLCL	PLLA	Technique
Structural properties	M_w ($\times 10^3$)		101.6 g.mol ⁻¹	102.4 g.mol ⁻¹	GPC
	polydispersity index (<i>D</i>)		1.7	1.5	
	Composition	%L-lactide	66.9 %	100 %	¹ H-NMR
		% D-lactide	17.4 %	-	
		%ε-caprolactone	15.7 %	-	
Microstructural magnitudes*	l_{LA}		6.68	-	¹ H-NMR
	l_{L-LA}		3.18	-	
	l_{D-LA}		1.27	-	
	l_{CL}		1.25	-	
	<i>R</i>		0.95	-	
Physical properties	<i>T_g</i>		34 °C	57 °C	DSC
	<i>T_m</i>		-	181 °C	
	<i>X_c</i>		-	42%	DSC (Equation 3)
	Thickness of film (μm)		$(16 \pm 2) \times 10^1$	$(18 \pm 2) \times 10^1$	Profilometer
Mechanical properties	Elastic modulus (MPa)	21 °C	$(76 \pm 7) \times 10^1$	$(181 \pm 2) \times 10^1$	Dynamometry
		37 °C	11 ± 1	$(142 \pm 7) \times 10^1$	
	Yield strength (MPa)	21 °C	21 ± 2	-	
		37 °C	0.7 ± 0.1	38 ± 2	
	Tensile strength (MPa)	21 °C	17 ± 1	56 ± 2	
		37 °C	1.6 ± 0.1	20 ± 1	
	Elongation at break	21 °C	$(35 \pm 4) \times 10^1$ %	4.0 ± 0.3 %	
		37 °C	>300 %	37 ± 2 %	
Surface properties	Contact angle		74 ± 3 °	84 ± 6 °	Contact angle measurement device

* (*l_i*) stands for the average sequence lengths of the molecular sequence *I* (LA, L-LA, D-LA or CL)

As expected, PLLA and PLCL films have very similar molecular weight and dispersity indexes that are confirmed by GPC measurements (table 5). The synthesized PLLA is semi-crystalline and shows a brittle behavior at 21 °C that becomes more ductile at 37 °C.

However, PLCL is completely amorphous. The high randomness of conformational arrangements, characterized by the randomness character value (R) close to 1, along with the incorporation of D-lactide, which disorders the microstructural arrangements of crystallisable L-lactide, lead to the shortening of its average sequence length ($l_{L-LA} = 3.18$). The presence of ϵ -caprolactone improves the viscoelastic properties of the synthesized material, avoiding the brittleness related problems as compared to PLLA. In this sense, the synthesized terpolymer exhibits a glassy thermoplastic behavior at room temperature. On the contrary, at body temperature, (37 °C) the material behave as a thermoplastic elastomer (TPE) with a low secant modulus. The working temperature (37 °C) being above the T_g (34 °C), it leads to a higher mobility of polymer chains and explains these remarkable elastic and viscoelastic property improvements in contrast with results from mechanical experiment performed at 21°C. Finally, the surfaces of both PLCL and PLLA films exhibit very similar contact angle values, therefore putting in evidence almost identical hydrophilicity character.

7.2 GPC and mass measurement results versus degradation time

Figure 43 shows molecular weight (M_w) data measured using GPC (Figure 43a), kinetic constants and half-life times calculated using a first-order reaction model (Equation 21 and 22; Figure 43b).

As expected, PLLA samples degrade slower at 37 °C than PLCL samples. PLLA films and fibers exhibit a loss of 45 % and 3 % of their M_w after 70 days of degradation, respectively, whereas PLCL samples show a decrease of around 90 % for both films and fibers (Figure 43a). Additionally, these molecular weight measurements indicate that films degrade faster than fibers for all investigated samples.

A first order degradation kinetics, known to appropriately describe bulk hydrolysis reaction of degradable polyesters [170], is used to determine the relationship between polymer molecular weights and degradation time. Accordingly, Equations 21 and 22 are used in order to compare and quantify degradation rates.

$$-\frac{d(M_w)}{dt} = k(M_w) \Rightarrow \ln(M_w) = -kt + \ln(M_{w0}) \text{ (Eq. 21)}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{|k|} \text{ (Eq. 22)}$$

where M_w is the weight-averaged molecular weight, M_{w0} is the initial weight-averaged molecular weight, k is the apparent degradation rate and $t_{1/2}$ is the half-life time of degradation. The calculation of k -values was performed by the fitting $\ln(M_w)$ in function of time curve with a linear regression using an exponential relationship.

Figure 43b reports the results of these regressions, which quantify the polymer degradation rate. Half-life times calculated from the kinetics curve ($t_{1/2}$) of the degradation reaction of PLLA degraded at 50 °C are 3 to 3.5 times lower than those measured at 37 °C. Moreover, modeling of the polymer degradation rate, calculated using the model developed by Weir et al [297], is in agreement with our experimental degradation data measured on films. PLCL films degraded at 37 °C for 70 days and PLLA films degraded at 50 °C for 120 days show slightly different molecular weights, respectively $(85 \pm 2) \times 10^2$ g/mol and $(66 \pm 5) \times 10^2$ g/mol, and half-life time degradation respectively 18.2 ± 0.1 and 23.9 ± 0.2 days.

Finally, M_w measured at the end of degradation, as well as $t_{1/2}$ values are similar for both PLCL films and fibers degraded either at 37 °C. On the opposite, the PLLA degradation rate profile strongly depends on the shape of the polymer samples as both films and fibers exhibit a completely different behavior, either at 37 °C or 50 °C.

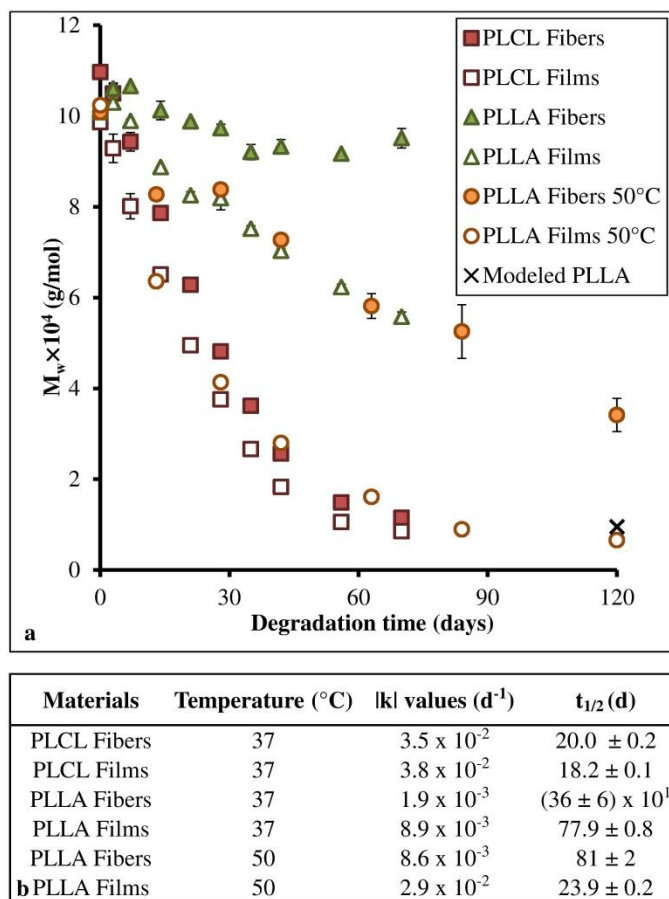


Figure 43. GPC measurement results, (a) Molecular weight as a function of the degradation time and (b) Half-life degradation times

As observed in Figure 44a, PLLA films and nanofibers do not experience significant weight loss during the course of the study. However, PLCL samples maintain their initial mass until 56 days of degradation, followed by a sharp mass decrease of about 30 % after 70 days. This mass loss in PLCL samples is accompanied by a significant increase of water absorption (Figure 44b).

As seen in Figure 44b, the water absorption of nanofibers is initially higher than the water absorption in films because of their higher surface to volume ratio. For example, the water absorption for PLCL films at day 3 was 5 ± 1 % whereas it is of 34 ± 4 % for PLCL nanofibers. However, after 56 days of immersion in PBS, the water absorption of PLCL

films is clearly higher than that of PLCL nanofibers due to their more advanced degradation state. In addition, it has to be pointed out that water absorption of PLLA nanofibers is clearly higher than PLCL nanofibers.

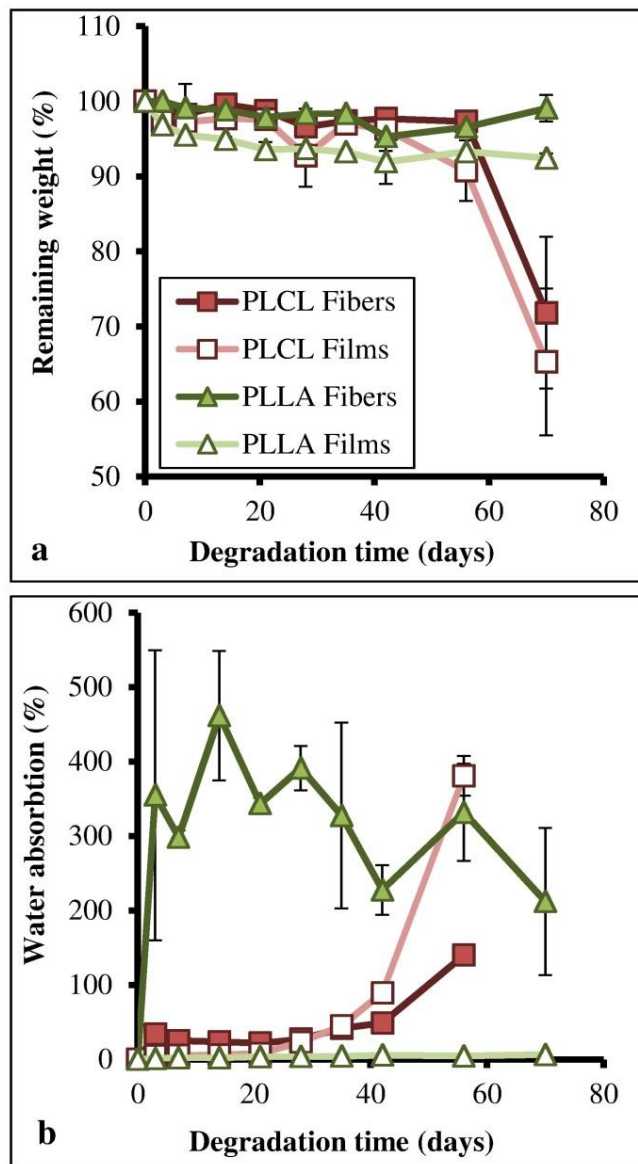
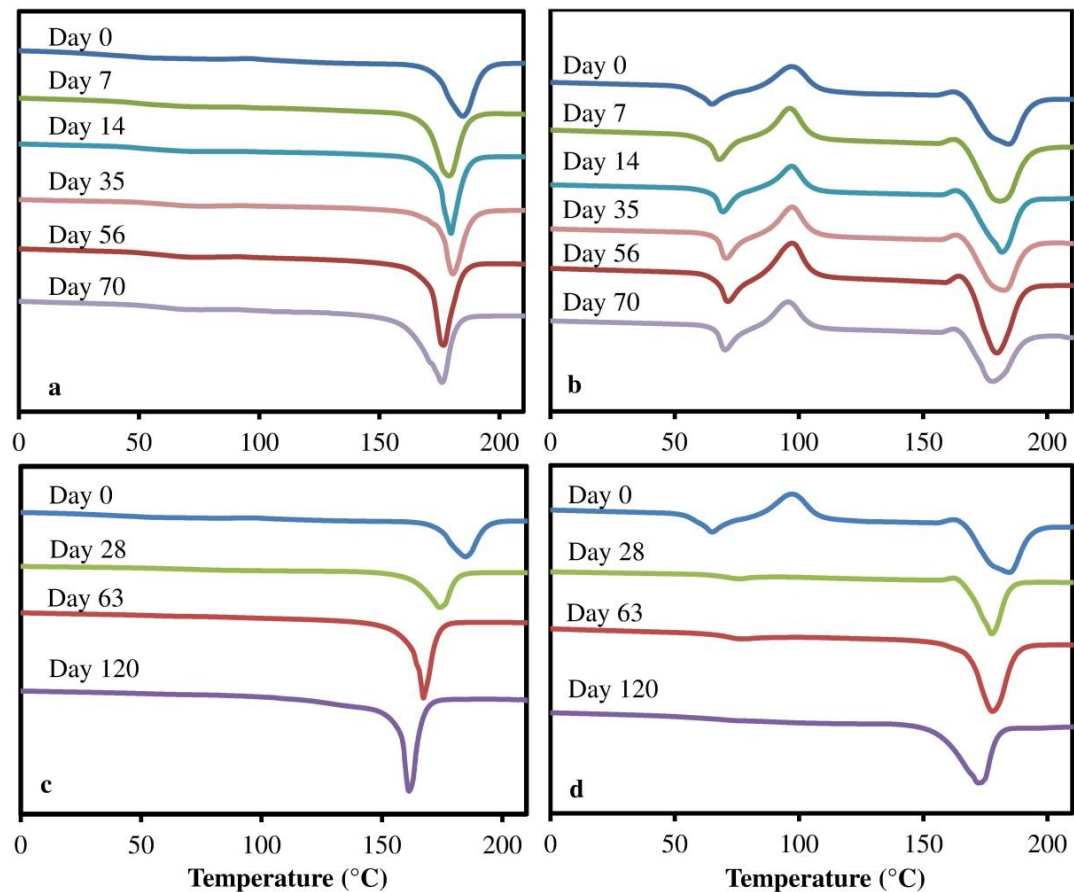


Figure 44. Mass measurements results, (a) Remaining weight and (b) Water absorption as a function of the degradation time at 37°C in PBS.

In summary, Figures 44 and 45 put in evidence a polymer M_w decrease concomitant with a constant overall weight for PLLA samples and a sharp decrease for PLCL samples after 56 days of degradation at 37°C, therefore pointing to a bulk degradation mechanism. In addition, these data also demonstrate that PLCL degraded faster than PLLA and that fibers degraded slower than films.

7.3 Thermal analysis versus degradation time

Figure 45 presents the first DSC runs for PLLA films and fibers degraded at 37 °C (Figure 45a and 45b) and at 50 °C (Figure 45c and 45d) and T_g calculated from the second DSC runs and X_c values for PLLA samples (Figure 45e).



e Features of PLLA samples					
Degradation Temperature	Degradation Time (d)	Fibers		Films	
		T _g (°C)	X _c (%)	T _g (°C)	X _c (%)
37°C	0	57.2	27	56.7	47
	7	55.0	27	51.5	51
	14	57.0	29	49.8	59
	35	56.9	26	54.4	55
	56	58.6	30	51.2	59
	70	51.8	26	47.6	61
50°C	28	51.0	53	54.2	64
	63	54.9	58	44.3	83
	120	49.7	61	49.7	90

Figure 45. DSC thermograms of PLLA film samples degraded at 37°C (a), PLLA fiber samples degraded at 37°C (b), PLLA film samples degraded at 50°C (c), PLLA fiber samples degraded at 50°C (d) and T_g and X_c of PLLA samples (e).

PLLA films degraded at 37 °C (Figure 45a) display a melting peak at 186 °C before degradation, with a progressive shift towards 176 °C upon degradation and a gradual increase of their crystallinity index (X_c) from 47 % to 61 % (Figure 45e). In addition, the T_g measured on the 2nd run of DSC (Figure 45e) exhibits a decrease from 56.7 °C to 47.6 °C during the degradation. These changes in PLLA are related to the reduction in molecular weight that leads to a decrease in molecular entanglement and an increase in chain mobility. Due to this higher mobility, the chains could reorganize themselves into a more ordered macromolecular arrangement and, accordingly, the crystallinity of PLLA increased. Moreover, since the hydrolysis occurs preferentially in amorphous regions, an increase of crystallinity of PLLA samples with degradation time is expected. These degradation behaviors are further catalyzed at higher temperatures (Figure 44c). For example, upon degradation at 50 °C, the crystallinity index can reach values as high as 83 % at day 63 and 90 % after 120 days of degradation (Figure 45e).

PLLA nanofibers show completely different DSC thermograms. As can be seen in Figure 45b, an endothermic peak is observed for PLLA samples degraded at 37 °C, overlapping with the glass transition, which can be associated to an enthalpic relaxation peak. Moreover, an exothermic peak appears between 80 °C and 100 °C indicating a cold crystallization and a reorganization of the PLLA nanofibers structure during the heating process. Finally, little changes are observed in these thermograms as a function of degradation time. Indeed, both T_m and X_c remain almost constant at around 180 °C and 30 %, respectively.

As opposed to the experiments performed at 37 °C, degradation of PLLA nanofibers at 50 °C lead to major changes in these samples DSC thermograms (Figure 45d). Indeed, the enthalpic relaxation as well as cold crystallization peaks disappears as a result of immersing the PLLA samples in an aqueous environment at a temperature close to their glass transition temperature. So, it is likely that chain scissions during degradation lead to a progressive decrease of T_g . Above this transition temperature, polymer chains are mobile and able to form crystalline phases, through a mechanism similar to the cold crystallization process, previously described. Relaxation and cold crystallization processes are non-

160

reversible transitions, therefore explaining their absence in the DSC thermograms after 28 days of degradation (Figure 45d). Accordingly, cold crystallization vanishing during degradation leads to a drastic rise of the polymer crystallinity index, increasing from 27 % for PLLA fibers before the degradation to 53 % after day 28. Finally, the increase of the index of crystallinity from 28 days to 120 days arises due to the degradation of the amorphous phases.

Figure 45 exhibits DSC thermograms of PLCL nanofibers as a function of degradation time. The absence of melting peaks highlights the fact that PLCL fibers are amorphous before the hydrolysis process and remain amorphous up to the end of degradation. Moreover, no enthalpic relaxation peak is observed since the temperature of degradation was above the T_g . In addition, the decrease of T_g values from 35.0 °C at day 0 to 27.8 °C after day 70 could also be associated to the presence of shorter chains with higher mobility. It should also be pointed out that the PLCL nanofiber thermograms presented therein are similar to those of PLCL film previously published [3].

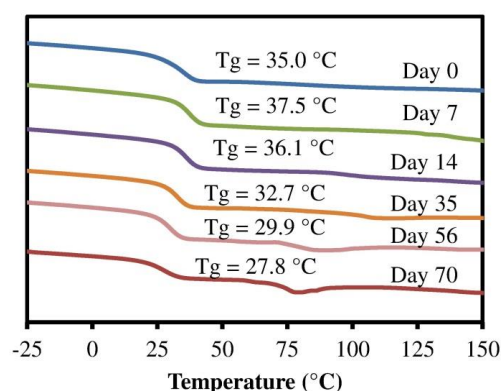


Figure 46. DSC thermograms of PLCL fiber samples degraded at 37°C

7.4 Morphology of samples as a function of degradation time

Figure 46 shows PLLA nanofibers morphologies before and after 35, 70 and 120 days of degradation at 50 °C, as visualized by SEM, along with the log-normal fitting of fiber diameter distribution. The R^2 value indicates the correlation between the experimental and the predicted values (Figure 47g).

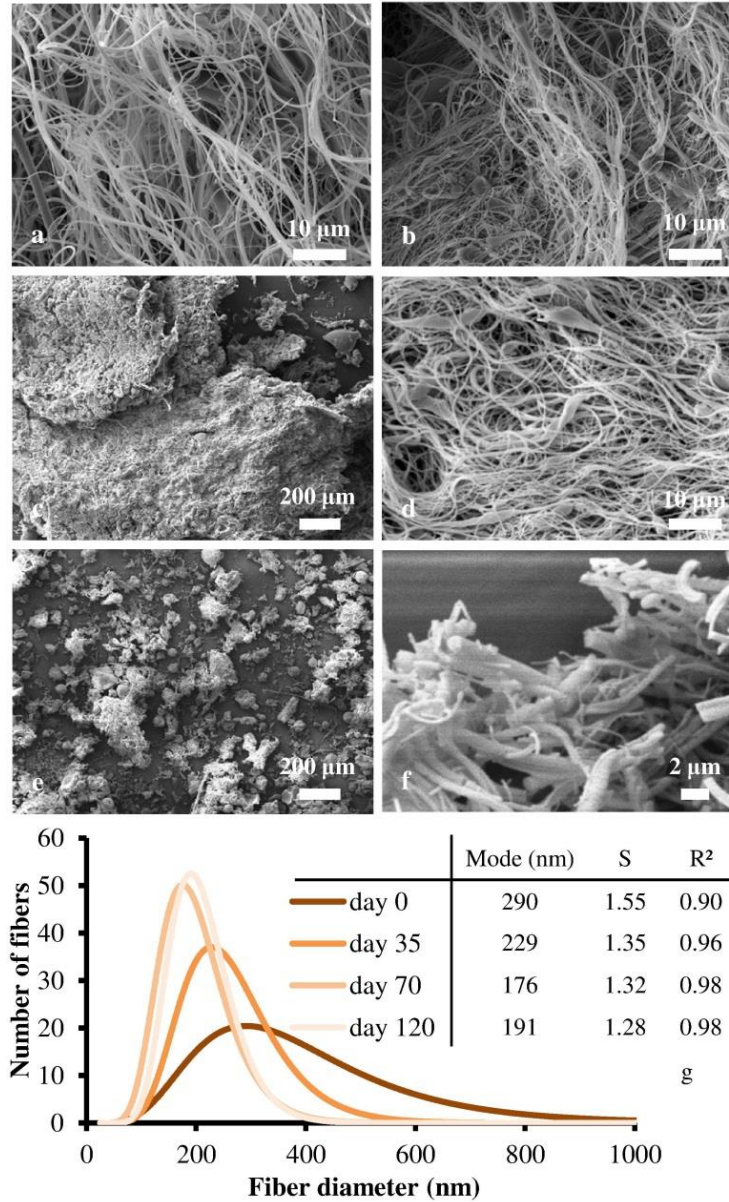


Figure 47. SEM images showing the evolution of PLLA nanofibers structure with accelerated degradation at 50°C, PLLA nanofiber scaffold before degradation (5000x) (a), PLLA nanofiber scaffold at day 35 (5000x) (b), PLLA nanofiber scaffold at day 70 (200x) (c), PLLA nanofiber scaffold at day 70 (5000x) (d), PLLA nanofiber scaffold at day 120 (200x) (e), PLLA nanofiber scaffold at day 120 (15000x) (f), Lognormal fitting of fiber diameter distribution (g). R² is the correlation factor between the fiber diameter distribution and the log-normal function and S is the shape parameter.

At day 0, nanofiber scaffolds display typical fibrous morphology that is produced by the air-spinning device (Figure 47a). The surface proportion covered by the fibers is largely over 90 % which confirms the choice of the setting parameters previously identified in a former article [287]. In addition, the distribution of fiber diameters can be correlated with a lognormal curve ($R^2 = 0.90$) displaying a maximum peak at 290 nm.

On the contrary, PLLA nanofibers degraded at 50 °C undergo important modification. First of all, the macroscopic visualization of fibers demonstrates a fibrous state at day 35 (Figure 47b). However, the fibers crumble at day 70 showing a powder-like morphology (results not shown) that is further confirmed by SEM observation (Figures 47c and 47e). Then, Figure 47e also indicate that the size of these remnants become smaller after 120 days. In addition, enlarged views (Figure 47d and f) evidence these samples, consisting of fiber fragments, were split during the degradation. Then, the mode of fiber diameters (Figure 47g) decreases from 290 nm before the degradation to 229 nm at day 35, 176 nm at day 70, and 191 nm at day 120. Finally, the shape parameter decreases with the degradation time, displaying values of 1.55 before the degradation and 1.35 at day 35, 1.32 at day 70, and 1.28 at day 120. Besides to indicate a smaller diameter of fibers, the evolution of these parameters allows measuring a sharper distribution of fiber diameter with modes moving toward lower values with the degradation time.

After 120 days of degradation at 37 °C, the mode of the distribution curve measured from the PLLA nanofiber diameters do not change significantly. Also, the morphology of fibers is not modified, as measured either by optical microscopy and SEM images (not shown). However, the shape parameter of the lognormal curve decreases with the degradation time.

Figure 48 illustrates the evolution of PLCL nanofibers morphology before and after 3, 35 and, 70 days of degradation at 37 °C, as visualized by SEM. Additionally, the log-normal curve fitting of fiber diameter distribution is shown in Figure 48g.

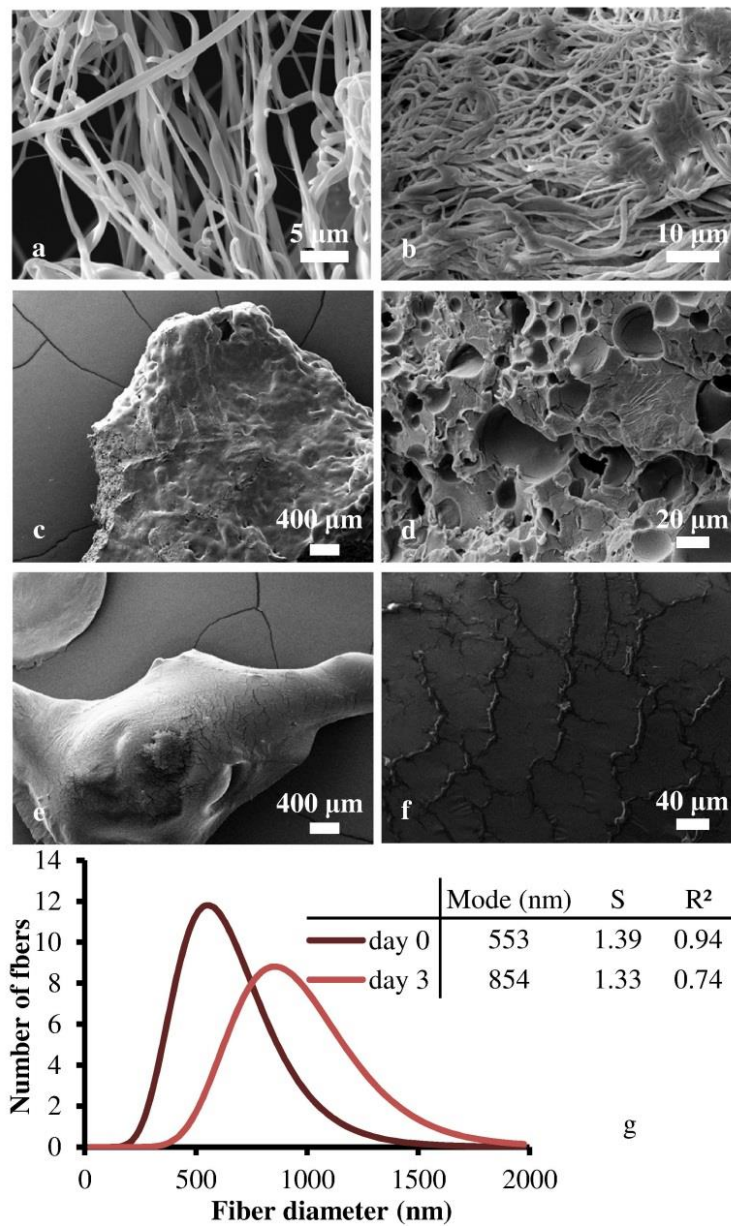


Figure 48. SEM images showing the evolution of PLCL nanofiber structures with degradation at 37°C, PLCL nanofiber scaffold before degradation (10000x) (a), PLCL nanofiber scaffold at day 3 (5000x) (b), PLCL nanofiber scaffold at day 35 (200x) (c), PLCL nanofiber scaffold at day 35 (5000x) (d), PLCL nanofiber scaffold at day 70 (200x) (e), PLCL nanofiber scaffold at day 70 (5000x) (f), Log-normal fitting of fiber diameter distribution (g). R² is the correlation factor between the fiber diameter distribution and the log-normal function and S is the shape parameter.

Before degradation, PLCL nanofiber scaffold presents the same non-woven fibrous morphology (Figure 48a) than PLLA nanofiber scaffold with a higher mode (553 nm vs 290 nm, respectively). Besides, the shape parameter, which is close to 1 (1.39), is indicative of a more symmetric fiber diameter distribution as compared to that of the PLLA scaffold (1.55; Figure 47g).

After 3 days of degradation, fibers swell and some parts of the sample show that nanofibers have merged (Figure 48b) leading to a global shrinkage of the scaffold. As a result, the mode of fiber diameter increases until 854 nm, with a wider distribution. Accordingly, the swelling of each fiber size population is characterized by a lower shape parameter (1.33).

At day 35, sample has totally shrunk (Figure 48c); fibers merge to produce a smooth surface and a porous core (Figure 48d). At day 70, the sample is glassy (Figures 49e and 49f) and have the same morphology than a PLCL film (results not shown).

7.5 pH measurements

Table 6 presents pH measurement results of group 9, 10 and, 11 samples at 37 °C and group 12, 13 and, 14 samples at 37 °C and 50 °C (see Table 4 for sample description). The pH was measured in sterile distilled water in which the samples are degraded and consequently, the solutions in which the measurements were performed consisted of water and the degradation products.

Table 6: pH measurements in water and in M199 medium

Samples	pH of the degradation medium (in water)			pH of the degradation solution and M199 medium (ratio 1:1)		
	Day 35	Day 70	Day 120	Day 35	Day 70	Day 120
Water	6.0 ± 0.2			-		
M199	-			7.42 ± 0.01	7.36 ± 0.01	7.46 ± 0.01
PLLA film 37°C 1g/L	4.6 ± 0.2	4.3 ± 0.2	3.7 ± 0.1	7.52 ± 0.01	7.49 ± 0.04	7.61 ± 0.05
PLLA fibers 37°C 1g/L	4.13 ± 0.04	4.05 ± 0.03	4.06 ± 0.04	7.52 ± 0.04	7.47 ± 0.02	7.65 ± 0.01
PLLA fibers 37°C 5g/L	3.81 ± 0.01	3.61 ± 0.01	3.61 ± 0.06	7.46 ± 0.00	7.51 ± 0.06	7.66 ± 0.02
PLLA film 50°C 1g/L	3.26 ± 0.08	3.11 ± 0.09	3.1 ± 0.1	7.1 ± 0.1	6.84 ± 0.05	6.88 ± 0.05
PLLA fibers 50°C 1g/L	3.7 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.1 ± 0.1	7.43 ± 0.07	7.30 ± 0.02	7.1 ± 0.1
PLLA fibers 50°C 5g/L	3.21 ± 0.02	2.93 ± 0.01	2.86 ± 0.01	7.10 ± 0.02	6.49 ± 0.05	6.85 ± 0.03
PLCL film 37°C 1g/L	4.15 ± 0.05	3.8 ± 0.2	-	7.57 ± 0.03	7.46 ± 0.03	-
PLCL fibers 37°C 1g/L	4.10 ± 0.01	4.0 ± 0.1	-	7.51 ± 0.04	7.48 ± 0.03	-
PLCL fibers 37°C 5g/L	3.73 ± 0.01	3.63 ± 0.04	-	7.44 ± 0.01	7.43 ± 0.04	-

First of all, the medium containing degradation products become acidic for every sample during degradation, which could potentially lead to an autocatalysis of the degradation. This is because the hydrolysis of PLA based polymer ester bonds leads to the formation of acidic by-products and consequently, to a pH decrease.

At day 35, the pH of the aqueous solution containing the PLLA film at 37 °C is higher than pH of PLLA fibers in the same conditions. However, in the case of solutions containing PLCL at 1 g/L, the pH variation upon degradation is almost similar for films and fibers. At 50 °C, the pH of the aqueous solution containing the PLLA film is significantly lower than that of the solution containing PLLA fibers. Moreover, samples degraded with a mass to volume ratio of 5 g/L have, of course, a lower pH than samples with a ratio of 1 g/L, highlighting a higher concentration of acidic by-products. Mixed at a 1:1 ratio with the M199 buffered culture medium, these aqueous solutions lead to pH ranging between 7.1 and 7.6, suitable for endothelial cell culture.

At day 70, a slight but significant drop of pH values is observed for all samples as compared to their counterpart at day 35, indicating that more degradation occurs. Solutions mixed with M199 and containing PLLA film at 50 °C and 1 g/L or PLLA fibers at 50 °C and 5 g/L lead to pH values of 6.84 and 6.49, respectively.

Table 6 showed that no major changes in pH occurs after 120 days of degradation in water as compared with measurements made at day 70, except for PLLA films at 37 °C and 1 g/L and PLLA fibers at 50 °C and 5 g/L that demonstrates a significant decrease.

Finally, the comparison between PLLA at 50 °C and PLCL at 37 °C highlights that acidic by-products released from degradation of caprolactone units are less acidic than those released from degradation of lactide units for the same degradation rate.

7.6 HSVEC adhesion and expansion before degradation

HSVEC adhesion (1h30; Figure 49a) and proliferation (2 and 4 days; Figure 49b) results are obtained from the fluorescence measurement of resorufin, which is the cell metabolism product of rezasurin.

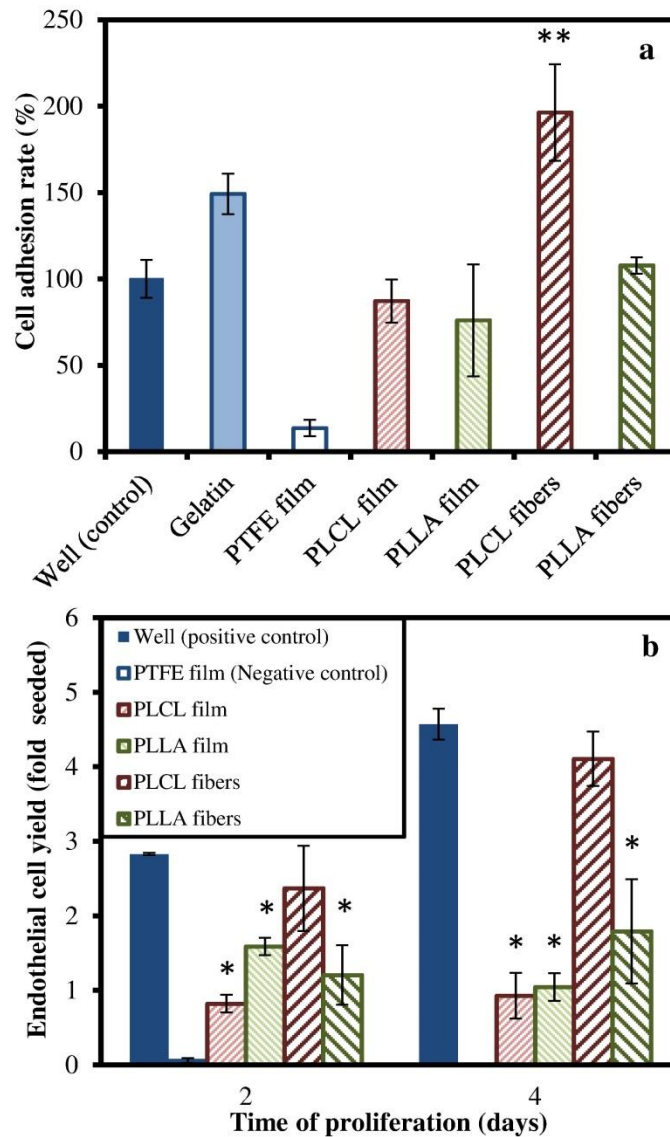


Figure 49. Adhesion (a) and expansion (b) of HSVEC before the degradation process (day 0). * = significant difference ($p < 0.05$) as compared to the PP treated well according to Kruskal-Wallis ANOVA test. ** = significant difference ($p < 0.05$) as compared to a gelatinized well.

Figure 49a demonstrates that the adhesion of HSVEC to PLLA and PLCL films is not statistically different from that observed in the PP treated well. However, PLCL fibers reveal to be very adherent surfaces, even resulting in a better outcome than gelatin positive control. In agreement with these promising adhesion results, cell spreading reveals to be higher on PLCL fibers as opposed to the behavior observed on either on PLLA films, PLCL films, and PLLA fibers. However, all investigated samples allow the adhesion and the proliferation of the EC as compared to the Teflon surfaces (negative control), which indicates a non-adherence and non-proliferation of the EC on the polymers surface for the first 4 days of culture.

7.7 HSVEC response to degradation products

Figure 50 shows cell toxicity outcomes after two and four days of cell spreading in the presence of degradation products for sample groups 9 to 14.

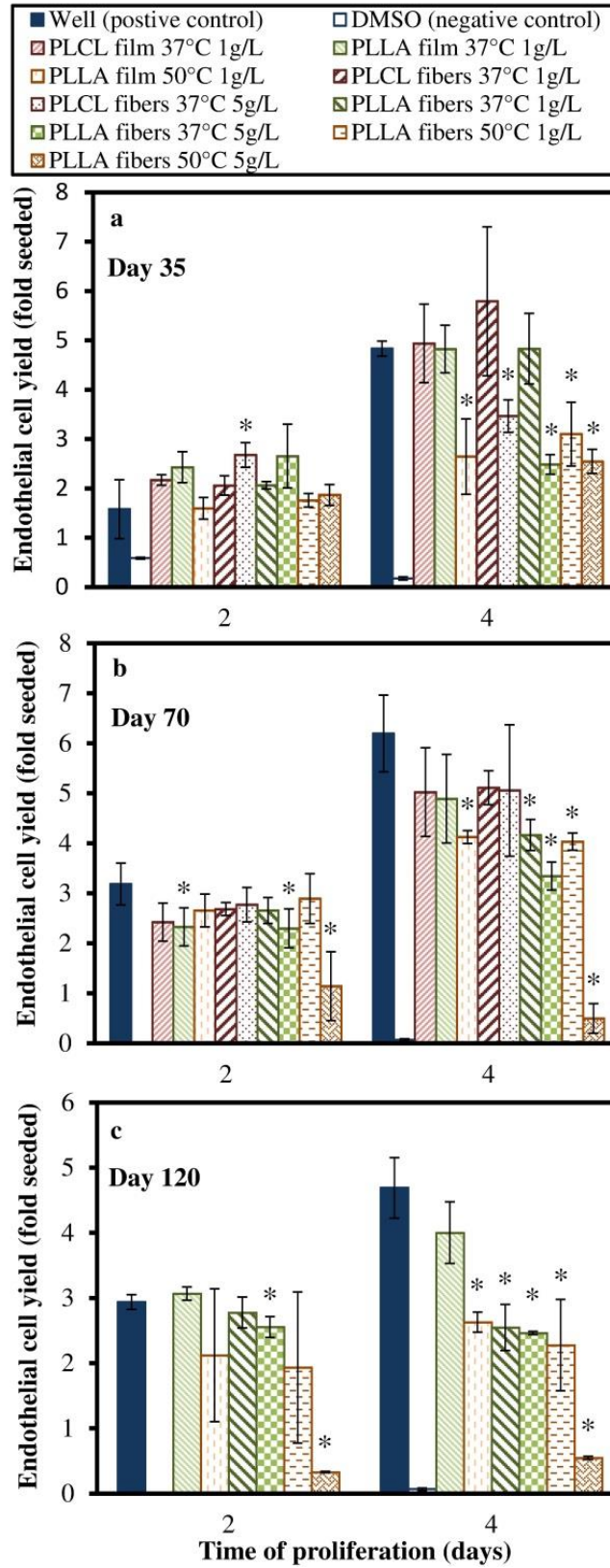


Figure 50. HSVEC response to sample degradation products after 35 days (a), 70 days (b) and 120 days (c) of degradation. The temperature and the mass to volume ratio correspond respectively to the degradation temperature and the fiber concentration in water during the degradation. * = significant difference ($p < 0.05$) as compared to the PP treated well according to Kruskal-Wallis ANOVA test.

After 35 days of degradation and 2 days of HSVEC proliferation (Figure 50a), HSVECs seems to proliferate well while in contact with every samples. Nonetheless, after 4 days of HSVEC proliferation, two distinct behaviors are observed with respect to the positive control. On one hand, PLCL film 37 °C 1 g/L, PLLA film 37 °C 1 g/L, PLCL fibers 37 °C 1 g/L and, PLLA fibers 37 °C 1 g/L lead to a HSVEC spreading similar to the PP well. On the other hand, PLLA film 50 °C 1 g/L, PLCL fibers 37 °C 5 g/L, PLLA fibers 37 °C 5 g/L, PLLA fibers 50 °C 1 g/L and, PLLA fibers 50 °C 5 g/L demonstrates an adverse and significant decrease in terms of HSVEC expansion. PLCL fibers 37°C 5 g/L shows a better HSVEC viability than PLLA fibers degraded either at 37 °C or 50 °C with a mass to volume ratio of 5 g/L.

After 70 days of degradation and 2 days of HSVEC proliferation (Figure 50b), no drastic difference in proliferation is observed between samples except for PLLA fibers 50 °C 5 g/L that show a lower EC yield which is, however, higher to the one observed in the DMSO solution. All samples exhibit EC proliferation lower than the positive control. After 4 days of spreading, PLCL film 37 °C 1 g/L, PLLA film 37 °C 1 g/L, PLCL fibers 37 °C 1 g/L, PLLA fibers 37 °C 1 g/L, PLLA film 50 °C 1 g/L, PLCL fibers 37 °C 5 g/L, PLLA fibers 37 °C 5 g/L and, PLLA fibers 50 °C 1 g/L exhibit similar EC proliferation yield than samples degraded for 35 days and PP treated well meaning that these samples show no adverse effect on HSVEC spreading. On the contrary, PLLA fibers 50 °C 5 g/L display behaviors that most resemble to those of the DMSO solution negative control, meaning that PLLA fibers degraded at 50 °C with a mass-to-volume ratio of 5 g/L are close to induce a cytotoxic response.

After 120 days of degradation and 2 and 4 days of proliferation (Figure 50c) in the presence of PLLA samples degradation products, HSVEC exhibit very similar behavior as 70 days of degradation.

Altogether, these results evidence that the PLLA degradation products, caused by the temperature-induced increase of PLLA degradation, have a negative impact on cell spreading. Nevertheless, none of these products demonstrate a cytotoxic behavior.

8. Discussion

8.1 Design of PLLA and PLCL terpolymer air-spun nanofibers

PLLA is a widely acknowledged degradable polymer that is used in several biomedical applications [159]. However, it suffers from several drawbacks, which are related to its intrinsic molecular structure. PLLA is considered as a highly crystalline polymer, thus displaying a slow degradation and resorption rates. Additionally, it shows brittle behavior at body temperature, being clearly inappropriate for those applications requiring highly elastic properties. For these reasons, an amorphous PLCL was designed and compared with a PLLA polymer. In order to make the best possible comparison, both polymers were synthesized using conditions leading to similar molecular weights and distribution (table 5) and formed either as hot-pressed films with identical thickness or nanofiber scaffolds. PLLA reveals to be an excellent control material because it contains both amorphous and crystalline phases, therefore allowing evidencing the propensity of each of these phases to induce cell toxicity. In addition, its glass transition temperature is well above 37 °C, as opposed to that of PLCL, which permits to ascertain the importance of polymer chain mobility on its degradation. Finally, the degradation behavior of PLLA films is extremely well known and can be tailored [171] to match the PLCL degradation rate for a suitable comparison between the two materials.

Accordingly, accelerated degradation experiments were performed to understand the effect of the polymer macro and micro structures on hydrolytic degradation with a specific focus on the mechanisms of nanofibers degradation. In addition, adhesion and proliferation of

HSVEC was assessed to evaluate the endothelial cell responses as a function of the same PLLA or PLCL level of degradation and to access which of these polymers would be the best candidate to be used as nanofiber scaffold for vascular biomaterials.

The new generation of PLCL terpolymer with distinctive features presented in this paper as basis material for air-spinning was also recently studied as film [294]. Copolymerization of L- or D-lactide with low glass transition temperature comonomers, such as ϵ -caprolactone, considerably improves elastic properties with respect to L- or D-lactide homopolymers. In addition, adding D-lactide units in L-lactide and ϵ -caprolactone based copolymers was shown to increase the amount of amorphous structure. Besides, modifying the monomer ratios allows fine-tuning of the polymer degradation rate from some days to some years. Lastly, controlling the length of l-lactide, d-lactide, and ϵ -caprolactone sequences during the polymerization process allows to prevent crystalline rearrangements at the beginning and during the hydrolysis reaction and, consequently, to a lower the glass transition temperature[294]. Basically, BiSS catalyst was demonstrated to increase the randomness number and block crystalline phases formation as compared to more classical catalysts like stannous octoate [296].

Designing new prostheses for blood vessel replacement requires meeting specific criteria. Indeed, prostheses must be compliant, kink resistant and flexible [91]. These mechanical characteristics are all related to the elastic properties of the material used for fabricating prostheses. In addition, prostheses have to be biocompatible and easy to manufacture. First of all, the elastomeric films of the PLCL polymer developed in a previous study of our group [30] and recently patented [295] were shown to present better elastic properties than PLLA. Because these mechanical properties are generally improved after spinning and polymer scaffolds are aimed to temporarily replace the proteins of the extracellular matrix, it is worth comparing the mechanical properties of PLCL with common natural elastic proteins. For instance, the elastic modulus of PLCL is equal to 11 ± 1 MPa with an elongation at break of 300 % at 37 °C. By comparison, natural common elastic proteins have an elongation at break between 100 % and 200 %, while elastin of bovine ligament shows an elastic modulus of 11 MPa [300]. Concerning biocompatibility, polylactides and

poly(ϵ -caprolactone) polymer films or nanofibers were extensively studied before degradation for decades [301,302] and used in biomedical applications, particularly in the vascular context. In addition, air-spun PLA nanofiber scaffold with a fiber diameter between 100 and 700 nm was proved to promote endothelial cell growth as monolayer [159], supplying a suitable structure to regenerate a functional endothelium. Figure 49 confirms these results by showing that the use of both PLCL and PLLA films and air-spun nanofiber scaffold are compatible with HSVEC adhesion and proliferation. Also, the air-spun PLCL nanofiber scaffold, presenting higher fiber diameters (Figure 48) but still in the sub-micrometer range, is evidenced to provide an appropriate scaffold surface for monolayer cell proliferation [303,304]. Finally, this work establishes the ease of adapting spinning parameters while changing polymer [287]. Meanwhile, the air-spinning process remains a useful, fast, cheap and safe route to produce non-woven nanofiber scaffold and, accordingly, could be easily scalable to industrial applications.

Working with degradable polymers for medical implant applications offers versatility in terms of temporary biological functionalities and drug delivery [305]. However, the non-cytotoxicity and biocompatibility of materials have to be investigated until completion of the degradation process. In this context, new specifications, related to the material degradation, have to be added to those initially required at the time of implantation [306]. For instance, crystallinity of PLA based polymers was questioned to play a role in acute foreign body reaction due to the accumulation of acidic by-products during the very long-term degradation of crystallites [307,308]. Furthermore, crystalline phases considerably delay the complete resorption of the device, which may reveal to be undesirable in the design of biomedical device requiring to be fully degraded in a specific period of time [230]. Because the crystalline phases of biodegradable PLA-based materials were somewhat adverse, the PLCL developed in the course of the present study is tailored to be amorphous throughout the degradation process, through appropriate control on the random distribution of the L-lactide, D-lactide, and ϵ -caprolactone along the polymer chain, with particular attention made on having short L-lactide sequences to avoid polymer crystallization during hydrolysis. Consequently, PLCL could be degraded faster, down to a

molecular length of few monomers. At the end of the degradation, polymeric short chains become soluble in biologic fluid and can then be easily metabolized by the body.

That said a unique polymer degradation rate may not be suited for all biomedical applications as it has to be tuned to take into account, of course, for the time required for cell proliferation, but also the strategy used for the device construction or the site of implantation. For example, strategies requiring *in vitro* cell seeding in scaffold-guided matrix need 2 weeks of static cell culture followed by 12 weeks in a bioreactor [50] for further *in vivo* neo-endothelialization for periods ranging between 2 and 24 weeks in rat, rabbit or dog models [309]. *In vivo*, polymer degradation could also be influenced by the mechanical conditions prevailing in the vasculature, such as the shear stress induced by the blood flow or the dilatation of the prosthesis [310]. This, in turn, is also likely to promote the delamination of the coating. Therefore, strategies for developing degradable scaffolds should take into account that degradation should occur after the proliferation of cells but before any delamination of the scaffold itself.

Considering aforementioned examples, PLCL constitutes an excellent candidate for vascular biomaterial applications because of its tunable degradation rate [294]. Indeed, PLCL films exhibits appropriate mechanical properties (Table 5) and remain amorphous from the beginning to the end of their degradation [3]. Finally, the use of appropriate synthesis conditions allows tuning the PLCL terpolymer degradation behavior. The PLCL presented in this study was designed to completely degrade after 12 weeks of *in vitro* hydrolysis degradation.

8.2 Degradation mechanisms

As expected, PLLA films degrade slower than their PLCL counterpart. Mechanism of film degradation is well described in the literature and attributed to bulk erosion [170,171,288]. First of all, water molecules diffuse inside the film, therefore leading to polymer chain scissions in the bulk material through hydrolysis. The hydrolysis of ester bonds leads, of course, to a polymer molecular weight decrease (Figure 43a) with, however, a constant

overall weight of the polymer assembly (Figure 44a), therefore indicating the entrapment of acidic smaller polymer chains in the core of the material. This, in turn, auto-catalyzes the degradation process caused by a pH gradient decrease, which is proportional to the film thickness [311]. During random chain scission, shorter chains with higher mobility are produced and the entanglements between the polymer chains are reduced, leading to an increase in free volume, which facilitates water diffusion. This explains that water absorption increases together with the reduction of molecular weight. Finally, once the polymer chains reach a threshold value of molecular weight, they became soluble in aqueous medium with a concomitant decrease of the film weight. Finally, oligomeric polymer chains become soluble in the aqueous medium, with a concomitant decrease of the film weight.

Surprisingly, nanofiber scaffolds degrade slower than films at 37 °C as well as at 50 °C for both PLCL and PLLA polymers. This difference, evidenced by the half-life time required for ester bond hydrolysis reaction, is higher at 50 °C than at 37 °C for PLLA samples (Figure 43). These results support different mechanisms of degradation between films and fibers. Indeed, there is no reason to believe that bulk erosion could be more important in fibers than in films. However, the apparent higher porosity (Figures 48 and 49) of fibrous scaffold, and the higher specific surface area of nanofibers with respect to films, may be taken into account to lead to a decrease of degradation by-products entrapment, therefore facilitating their release in the media and consequently, reducing the auto-catalytic degradation rate.

The presence of a relaxation peak on DSC thermograms of PLLA nanofibers (Figures 46b and d) indicates a more organized and packed chain structure in the amorphous phase of the polymer, in agreement with a reduction in free volume over the degradation period [312]. The enthalpy associated to this relaxation peak was of 9.4 J/g for the PLLA fiber samples before degradation at 37°C, and readily stabilize to 15.4 J/g at day 14 up to the end of the investigated degradation period. This behavior signifies that the PLLA chains become more packed from the beginning of the degradation process (up to 14 days) and keep such a packing up to 70 days of degradation. Furthermore, the gain in polymer chain mobility

right after the T_g , combined to the presence of more ordered chain structures in the amorphous phase, favor the subsequent cold crystallization process that occurs just above the glass transition, as observed by an exothermic peak near 100°C. The packing of polymer chains in fibers therefore plays a role in their degradation mechanism by reducing diffusion of water in their core. Indeed, polymer chains within fibers are relatively oriented in the fiber axis forming an amorphous phase which is, however, capable to crystallize while heating. These typical phase has been previously described in the literature and was named interphase [313]. This organization induced by heating is not observed in the PLCL fiber thermograms because the synthesis conditions of PLCL lead to the absence of interaction between polymeric chains and hence, to the absence of organization (table 5). Despite a very low degradation rate, PLLA nanofibers undergo some changes like packing of polymer chains that can be visible and quantified by analyzing SEM images. For instance, fiber diameter distributions were evaluated and fitted with a log-normal curve, which allows determining the mode and the shape parameter of the distribution function. Regarding to PLLA nanofiber samples degraded at 37 °C, the mode of fiber diameter do not change significantly but the shape parameter decreased (result not shown), which is characteristic of a sharper distribution. Indeed, the population of larger fibers decreases and the number of fibers around the mode value increases, due to a packing of the polymer chains.

As previously mentioned, using nanofiber structure combined with their potential for biodegradation could be of interest for many biomedical applications. The fabrication of biodegradable polymer as nanofiber scaffold for these applications has been widely studied but, to our knowledge, the degradation behavior of PLA-based nanofiber scaffolds is poorly reported in the literature and rarely compared to standard sample like polymer films or pellets [314]. Because of a higher surface to volume ratio, nanofibers should intuitively degrade faster than films or macroscale polymeric device. However, the present study shows the opposite behavior. Indeed, bulk degradation mechanism of PLLA air-spun nanofibers, as compared with films, consists in the co-addition of two main effects that are

porosity of scaffold leading to a decrease of the auto-catalysis process and the packing of polymer chains, which lead to a decrease of the water diffusion.

Because of the low degradation rate of polylactides, temperature-catalyzed degradation have been commonly used to shed more light on the degradation process of these polymers within reasonable delays [171,205,207]. In the present article, PLLA samples degradation has been accelerated by performing the experiments at 50 °C for 120 days to match the degradation rate of PLCL films at 37°C for 70 days (Figure 43) according to the model established by Weir et al [297]. This comparison between PLLA and PLCL films with the same degradation rate has been put forward to evaluate the influence of the crystalline phases and degradation products nature of PLCL and PLLA on the evolution of pH during the degradation process, as well as endothelial cell behavior. The relevance of this comparison is confirmed by the similar trends of PLLA films degraded at 50 °C and PLCL films degraded at 37 °C. DSC thermograms of PLLA films degraded at 50 °C (Figure 45c and 45e) highlight that the presence of shorter polymer chains with higher mobility may decrease the T_g below 50 °C, which, in turn, could lead to a drastic change in the degradation behavior. Indeed, a higher mobility of polymer chains occurred by overpassing T_g , leading to a greater penetration of water inside the film, which accelerates the degradation of amorphous phases and decrease the auto-catalytic effect due to a greater release of degradation products [315].

Regarding to the fiber samples degraded at 50 °C, the degradation rate is lower than that observed for films (Figure 43). In addition, the disappearance of the crystallization peak observed as a function of the degradation time (Figure 45d) confirms that the T_g of the polymer progressively decreased from a temperature higher than 50 °C to a temperature slightly below 50 °C over the investigated degradation period. Indeed, the mobility of chains, that is possible above T_g , and the presence of the previously mentioned interphases, induce the crystallization of PLLA fibers samples during the degradation. The degradation mechanism highlighted for PLLA nanofibers at 50 °C is also supported by the evolution of fiber morphology and the SEM image analysis (Figure 47). The increase of crystallinity index (Figure 45e) due to the degradation of the amorphous phase is observed as an

important polymer morphology change from fibers to crumble-like samples. The mechanism described by Zong et al [224] for PLGA nanofiber degradation at 37 °C is fairly similar to the degradation of PLLA nanofibers at 50 °C. First of all, a degradation temperature above the T_g promotes the growth of crystalline phases. Then, water molecules penetrate in amorphous phases, degrades the nanofibers, and forms new smaller crystalline lamellae with higher hardness. Finally, nanofibers break down in smaller pieces. Our SEM analyses bring new information about this mechanism. As a matter of fact, the evolution of the fitted log-normal curve demonstrates that the mode and the shape parameter decrease. The slight increase of the shape parameter indicates a faster degradation of fibers with smaller diameters. Concomitantly, the decrease of the mode from 290 nm to 176 nm after day 70 may be related to the crystallization of bigger fibers, from a large amorphous domain to a smaller and more organized crystalline domain that reduce the free volume inside fibers. Finally, the stabilization of the mode value from day 70 to day 120 and the decrease of the degradation rate seem to arise from the shortening of nanofibers in the transverse direction. At this point, it is worth mentioning that nanofiber diameter distribution is often described as log-normal curve [316] but, to the best of our knowledge, the parameters that describe such a distribution, as the mode and shape parameter, was never used to quantify and understand the evolution of fiber morphology during degradation.

As opposed to PLLA degradation, PLCL nanofibers and PLCL films displays analogous degradation behaviors, as seen from Figures 43, 46 and previous article [3]. On one hand, these results can be explained because, as opposed to PLLA, no crystalline organization occurs in PLCL (Table 5). On the other hand, the evolution of PLCL nanofiber sample morphology upon degradation (Figure 48) shows that PLCL fibers merged in the early days of the degradation process with concomitant shrinking due to the presence of water. Indeed, water molecules easily penetrate inside the sample due to higher chain mobility, as evidenced by a T_g lower than 37 °C (Figure 46). This behavior is associated to the increase of fiber diameter (Figure 48g) and, consequently, a decrease of scaffold porosity [314]. Concomitantly, the shape parameter (Figure 48g) decreases as a function of degradation

time, meaning that water diffuses easily in fibers leading to a larger diameter distribution. Fibers are then stuck between them, forming a continuous structure outside the sample after day 35, and leaving a porous structure inside the sample (Figure 48c and 48d). After day 70, samples become transparent (data not shown) and presents a morphology similar to a film (Figure 48e and 48f), with a degradation behavior characteristic of such sample morphology. In addition, Figure 45 confirms this statement by showing a slight increase of water absorption after 3 days of degradation that remains constant until 42 days of degradation. Moreover, after few days of degradation, the PLCL nanofiber samples behave like a film in terms of water absorption (Figure 44b), as opposed to PLLA nanofibers, which absorb a high amount of water because of the porosity of the scaffold. As a result, due to these early and non-reversible shrinkage and plasticizing effect of water, PLCL nanofibers samples and PLCL films display almost identical degradation behaviors.

The evolution of electrospun fiber morphology during their degradation was documented for PGA [317], semi-crystalline PLGA [224], amorphous PLGA [317], and semi-crystalline poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) [317]. Altogether, these studies highlighted two types of evolution of nanofiber scaffold during the degradation. On one hand, nanofibers are semi-crystalline and break during the degradation or nanofiber material is totally amorphous and the scaffold shrinks during the degradation process above T_g . On the other hand, the percentage of shrinkage is directly related to the difference between T_g and the degradation temperature of the amorphous nanofibers. Results from Figures 48 and 49 are in agreement with these studies [314]. The degradation at 50 °C induces a crystallization of PLLA nanofibers, due to a rearrangement of initially amorphous phases, leading to smaller fiber diameters and an increase of brittleness. On the contrary, PLCL nanofibers show an amorphous structure and the degradation at 37°C inducing a fast inflation of fibers without crystallization and, as a result, the porosity decreases and the sample shrink. Finally, the degradation at 37 °C of semi-crystalline PLLA nanofibers allows evidencing another degradation mechanism. In this case, the degradation process at a temperature far below T_g is very slow due to the packing of polymer chain. However, this packing increases during the degradation at 37 °C inducing a decrease of the number of the larger fibers.

By comparison with film or pellet degradation, studying degradable nanofiber brings additional information that allows understanding the evolution of fiber morphology features like porosity or diameter evolution during degradation.

8.3 Long-term cytotoxicity

Comparison of pH values (Table 6) between samples are in accordance with previously described degradation mechanisms. First, increase the degradation temperature from 37 °C to 50 °C lead to a decrease of pH values because of an increase of the degradation kinetics. Second, aqueous solutions containing PLCL sample degradation products are more acidic than those where PLLA is degraded at 37 °C because of the very low degradation rate of PLLA samples at this temperature. Nevertheless, the pH of the degradation medium over PLLA samples at 50 °C is lower than the one of PLCL samples at 37 °C, despite a similar degradation rate, meaning that degradation products made of lactic acid are more acidic than those arising from the degradation of caprolactone-based polymers. Third, PLLA fibers lead to more acidic degradation products than PLLA films at 37 °C since fiber degradation lead to fewer degradation by-product entrapments. On the contrary, the aqueous solution over PLLA fibers is less acidic than that over PLLA films at 50 °C due to the higher degradation rate of films as compared to fibers. Besides, aqueous media over PLCL fibers and films display almost identical pH values, in agreement with the fact that these samples degraded with a very similar kinetics and confirming the gradual conversion of fibers into films during the degradation process. Finally, degradation of fibers in a lower volume of water led to a lower pH value due to a higher concentration of degradation products. Finally, Table 6 shows that the buffer strength of M199 did not counterbalance the pH decrease induced by PLLA degradation at 50 °C, therefore indicating that the degradation of PLLA could lead to pH-induced cell toxicity.

Before degradation of samples, the level of HSVECs adhesion on PLCL and PLLA films and fibers is equivalent or even higher to that measured on the positive control (Figure 49a). Concerning proliferation results, every sample exhibits non-cytotoxic behavior (Figure 49b). HSVECs do not proliferate significantly on film after 4 days. However,

nanofiber samples exhibit a more convenient environment for rapid HSVEC proliferation. These results also evidence that HSVEC spreading is clearly dependent on their adhesion rate on samples. Concerning PLA-based film samples, cells take more than 6 days to proliferate [318]. Besides, these results confirm, as widely acknowledged in the literature, that nanofiber scaffolds constitute more appropriate structures for cell spreading [161,276,309]. Finally, HSVEC adhesion on PLCL fibers is higher than that observed on either PLLA fibers, PP treated wells, and gelatinized wells, therefore highlighting the great potential of PLCL nanofiber scaffold for vascular tissue engineering and regenerative medicine applications.

The design and development of a biodegradable biomedical device require, evaluating its long term *in vitro* cytotoxicity. As demonstrated in this publication, polymeric device properties evolve all along the degradation. Indeed, the polymer molecular weight decreases with a concomitant modification of the polymer microstructure and scaffold morphology and by-product release, which lead to pH decrease of the cell culture media. This leads to a highly dynamic environment, where each of these evolving conditions may have a major influence on the cell fate.

The potential cytotoxicity and inappropriate tissue response of PLLA has been the subject of several *in vitro* studies as well as pre-clinical and clinical investigations [319]. Moreover, commercial or custom-made polylactide films possible toxicity was also evidenced *in vitro* with fibroblast cells [188,293]. All these studies concur to demonstrate that PLA films or pellets toxicity is due to an increase of crystallinity during its degradation, to the late degradation of crystalline phases, and to the inappropriate nature of degradation products leading to an important pH decrease. Indeed, PLA degradation behavior could lead to apoptosis, depending on cell tolerance to low pH [320]. Moreover, it is likely that the pH at which the cells are subjected is higher than the one that is experimentally measurable since the local pH at the surface of implants is definitely higher than in the solution, therefore leading to more cell toxicity. In this context, PLCL seems to be a suitable alternative, which provides an appropriate HSVECs response to degradation products. The pH of the solutions over PLCL samples remains higher than over PLLA

182

probably because PLCL remains amorphous throughout the degradation period. Finally, PLCL and its degradation products are demonstrated to have no effect on cell spreading. This polymer is therefore likely an excellent candidate for future tissue engineering applications in which tunable degradation rates are required.

9. Conclusion

This work investigates the possibility of using a PLCL terpolymer air-spun nanofiber scaffold for vascular tissue engineering and regenerative medicine applications. In addition to demonstrate appropriate elastomeric and structural properties, this novel PLCL terpolymer had a suitable degradation rate, which lead to its complete hydrolysis after 12 weeks without crystallization. A comparison between PLCL and PLLA nanofiber scaffolds and films upon degradation at 37°C allow getting a better understanding of the evolution of these polymer structural and dimensional features during the degradation. PLLA nanofibers exhibit a lower degradation rate than films because of the porosity inherent to the nanofibrous structure and the packing of polymer chains whereas PLCL films and nanofibers display very similar degradation rate and remain amorphous during all the degradation process. An accelerated degradation of PLLA nanofibers and films was performed at 50 °C to match the PLCL degradation rate. This enables to compare the impact of PLLA crystalline phase on the polymer degradation behavior with that of amorphous PLCL nanofibers. PLLA nanofibers degraded at 50 °C crystallize during the degradation process and present a brittle behavior while a rapid shrinkage is observed on PLCL nanofibers and, as a result, PLCL nanofibers readily behave as a film. In addition, the distributions of the nanofiber diameter evolution upon degradation were fitted with log-normal curves, which allow providing new insights of nanofiber degradation mechanisms. Finally, the increase of HSVEC adhesion on PLCL nanofibers, coupled with a non-cytotoxic effect of these polymer degradation products, indicates that PLCL is a suitable alternative to PLLA to produce nanofiber scaffold for vascular biomaterials.

10. Acknowledgements

The authors acknowledge Dr Stephane Turgeon from CHU de Québec for his advices on statistical analyses and Arnaud De Coninck from ETE INRS of Quebec City for his SEM technical support and Lucie Levesque from LBB for her help on bacterial culture. This work was co-supported by Region Alsace, the National Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, and the Centre Québécois sur les Matériaux Fonctionnels (CQMF).

11. Supporting information

¹H-NMR characterization of PLCL and GPC chromatogram of PLCL and PLLA nanofibers. Both α and δ methylenes give rise to two NMR signals (two triplets). The signals of the α and ε methylenes at the lowest chemical shifts, at 2.30 and 4.06 respectively, correspond to the CL-CL dyad, while the ones at lowest field (at 2.37 and 4.11) can be assigned to the CL-LA dyad. In the case of LA unit signals, the H-H coupling hinders this type of analysis significantly and the signals corresponding to LA-LA and LA-CL are overlapped in the LA methine signal at 5.15 ppm, even though the quartet at highest field, at $\approx$ 5.07 ppm, could be assigned to sequence LA-CL. Taking into account the fact that the LA-CL dyad contribution to the LA methine signal takes the same relative molar fraction obtained for the CL-LA dyad, the experimental integration of the α and ε methylenes provides a way of calculating the total relative molar fraction of the CL-LA dyad. In this way, all the average dyad relative molar fractions could be calculated and therefore, the copolymer composition and the microstructural magnitudes of the copolymers could be obtained. L-LA and D-LA are indistinguishable in the NMR spectrum so their contents and average sequence lengths are approximate values calculated on the assumption that the reactivities of both L-LA and D-LA are the same (taking into account the L-LA:D-LA feed ratios), that is, the reaction performed using the bismuth based catalysts is not stereoselective. Equations (Equation 23 to 25) were employed to obtain the number-average sequence lengths (l_i), the Bernoullian random number-average sequence lengths (l_i) and the randomness character (R):

$$\begin{cases} l_{LA} = \frac{2(LA)}{LA - CL} \\ l_{CL} = \frac{2(CL)}{LA - CL} \end{cases} \quad (\text{Eq. 23})$$

$$\begin{cases} (l_{LA})_{random} = \frac{1}{LA} \\ (l_{CL})_{random} = \frac{1}{CL} \end{cases} \quad (\text{Eq. 24})$$

$$R = \frac{(l_{LA})_{random}}{l_{LA}} = \frac{(l_{CL})_{random}}{l_{CL}} \quad (\text{Eq. 25})$$

where (LA) and (CL) are the lactide and ϵ -caprolactone molar fractions, obtained from the integration of the lactide methine signals and the ϵ -caprolactone methylene signals, (L-LA) and (D-LA) are the L-lactide and D-lactide approximate molar fractions and (LA-CL) is the LA-CL average dyad relative molar fraction.

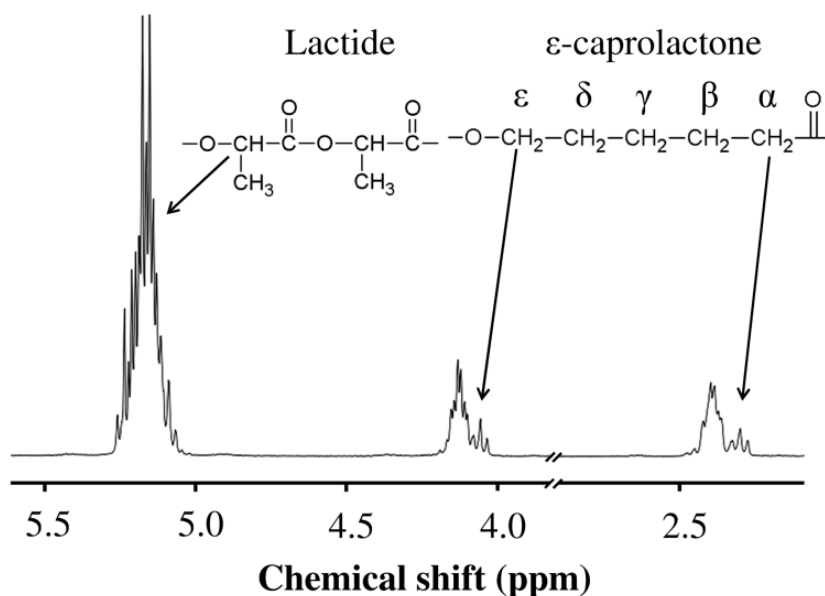


Figure 51. ^1H NMR spectrum of PLCL. $\delta_{LA}=5.15$ (lactide methine), $\delta_{\epsilon}=4.1$ (ϵ -methylene of ϵ -caprolactone) and $\delta_{\alpha}=2.35$ (α -methylene of ϵ -caprolactone).

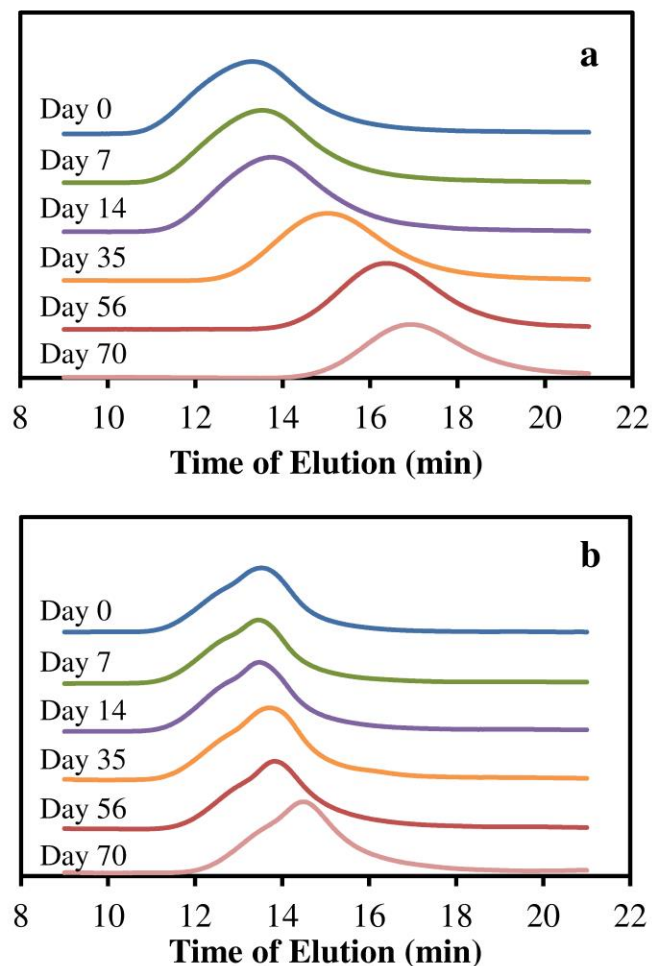


Figure 52. GPC chromatogram of PLCL (a) and PLLA (b) nanofibers degraded at 37°C

Bacterial culture results. Figure 53 shows result from bacterial and fungus culture before and after sanitization of sample with penicillin-streptomycin solution. These petri dishes were cultured after 8 days of incubation and displayed no bacterial or fungus proliferation onto or inside PLCL or PLLA fiber and film samples after sanitization procedure. This result proves that sanitization procedure can be used before cell culture to avoid bacterial proliferation during the 4 days of cell proliferation.

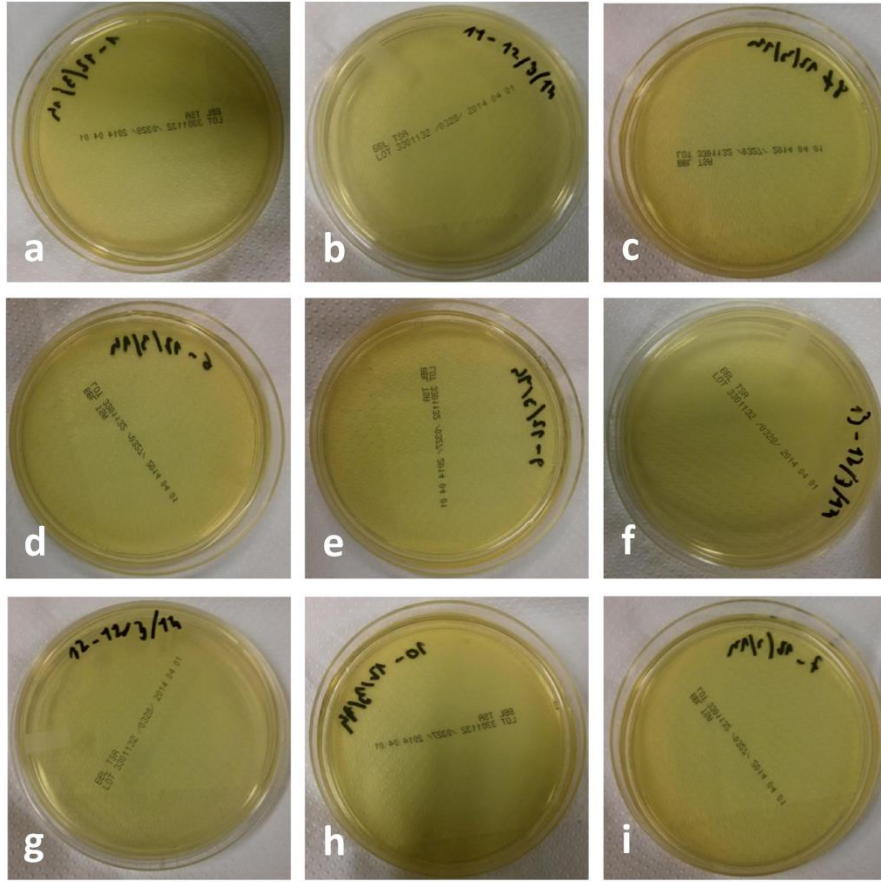


Figure 53. Bacterial and fungus culture before and after sanitization of sample with penicillin-streptomycin, control sample (a), PLLA film without sanitization (b), PLLA film with sanitization (c), PLLA nanofibers without sanitization (d), PLLA nanofibers with sanitization (e), PLCL film without sanitization (f), PLCL film with sanitization (g), PLCL nanofibers without sanitization (h), PLCL nanofibers with sanitization (i).

Chapitre VI. Discussion générale

1. Discussion

1.1 Dégradation de nanofibres de PLAs commerciaux

Comme énoncé dans la section 4.3 du projet doctoral, l'acide polylactique est un polymère composé de deux énantiomères L et D et provient de l'ouverture de cycle d'un dimère appelé lactide qui peut lui-même se présenter sous la forme LL, DD ou DL [236]. Pendant la polymérisation, ces dimères peuvent donc s'agencer de manière stéréosélectives [321] suivant les conditions de polymérisation pour obtenir plusieurs types de PLAs. Par exemple, le PLLA est hautement cristallin par rapport au PDLLA qui, quant à lui, est amorphe ce qui conduit à des propriétés mécaniques, physiques et de dégradation différentes. Par conséquent, la caractérisation des séquences composant les chaînes des polymères utilisés ainsi que l'analyse de leur dégradation relèvent d'une grande importance. De plus, la dégradation du PLA a toujours été étudiée au niveau global, le plus souvent par GPC et mesure de masse. Mais, à notre connaissance, la dégradation du PLA n'a jamais été explorée en fonction de la stéréochimie du polymère de manière expérimentale.

Un premier PLA, appelé PLA1 dans le chapitre III, avait été utilisé dans les travaux précédents dans le but de recouvrir les prothèses vasculaires en PET et de démontrer que ce matériaux, sous forme de nanofibres filées par jet d'air, permettait l'adhésion et la prolifération des cellules endothéliales. Un deuxième PLA, appelé PLA2 dans le chapitre III, a été choisi parce qu'il possédait une plus grande cristallinité, un ratio L/D plus grand mais une masse moléculaire identique au PLA1. Ces deux PLAs ont été filés par jet d'air, dégradés et analysés par NMR du proton en mode classique afin d'obtenir l'évolution de la masse moléculaire et en découplage homonucléaire afin d'avoir l'évolution de l'agencement des PLA en fonction de la dégradation.

L'étude de la masse moléculaire avant et après filage démontre que le système de filage par jet d'air n'occasionne aucune rupture de la chaîne polymérique.

Les résultats de NMR classique ont montré qu'un PLA plus cristallin et composé de plus de séquences LLA se dégradait plus vite. La NMR par découplage homonucléaire a permis de mieux comprendre la dégradation du PLA d'un point de vue de l'arrangement moléculaire. En effet, cette première étude montre que la dégradation par hydrolyse de la liaison ester est exercée de manière privilégiée sur les séquences isotactiques (LL ou DD) que sur les séquences stéréotactiques (LD ou DL) en fonction du temps de dégradation. Ce phénomène peut être expliqué par la présence de ponts hydrogènes et de liaisons dipôle-dipôles intramoléculaires et intermoléculaires statistiquement plus fortes sur les séquences stéréotactiques [190,191].

De manière générale, le chapitre III de cette thèse a permis de contribuer à la compréhension de la dégradation du PLA dans le but de concevoir des polymères à dégradation contrôlée pour des applications, non seulement biomédicales, mais aussi environnementales ; le PLA étant un polymère biodégradable issu de ressources renouvelables (amidon) et un potentiel successeur aux plastiques communément utilisés dans les industries des emballages ou textile. Pour une application en tant que biomatériau vasculaire, le PLA, uniquement composé de LLA, DLA et DLLA, possède des propriétés d'élasticité trop faible. De plus, ce polymère se dégrade trop lentement et peut être une limite à la conception de dispositifs à dégradation plus rapide. Il est également souvent remis en question en regard de sa possible cytotoxicité dans les derniers stades de sa dégradation à cause de la grande acidité de ses phases cristallines [188].

L'adéquation de tous ces inconvénients a permis de conclure que le PLA n'était pas le meilleur candidat pour être appliqué comme biomatériau vasculaire. Cependant, son utilisation quasi-systématique comme matériau de base dans la conception de système biodégradable dans le domaine vasculaire fait de lui un excellent matériau de contrôle dans le but de concevoir un polymère en adéquation avec un cahier des charges plus approprié (matériau plus élastique, dégradation plus adaptée, etc.). Le PLA sous diverses formes

(PLA1, PLA2 et PLLA) a été donc utilisé comme modèle (chapitre IV) et contrôle (chapitre V) dans cette thèse.

1.2 Optimisation du filage par jet d'air pour la fabrication de nanofibres de polymères

Les recherches précédentes ont démontré que les nanofibres de PLA permettaient la croissance des cellules endothéliales mais l'optimisation de la fabrication des nanofibres reste en suspens [1]. De plus, en vue d'utiliser des matériaux alternatifs au PLA, il est nécessaire de concevoir des procédures simples pour pouvoir appliquer cette optimisation à d'autres polymères. La plupart des travaux dans l'optimisation des nanofibres sont la plupart du temps reliés au filage électrostatique et malgré ses ressemblances avec le filage par jet d'air, il n'est pas possible de faire de lien direct entre les deux méthodes [321–323]. Il est donc nécessaire de faire cette évaluation pour le filage par jet d'air.

La première étude décrite dans le chapitre IV a pour objectif d'évaluer la morphologie des fibres de PLA, utilisé comme matériau contrôle, produit par filage par jet d'air en fonction de la concentration des solutions utilisées et du diamètre de l'aiguille. Les résultats ont montrés trois types de morphologies dans les échafaudages : des perles, des fibres et des éléments non-filés surfaciques appelés « flaques ». À notre connaissance, les flaques n'ont jamais été référencées dans la littérature et proviennent d'instabilité du flux d'air à haute concentration. La solution polymérique, trop visqueuse, n'est pas assez étirée par le flux d'air. Au contraire, à faible concentration, on observe l'apparition de perles expliquée, par la suite, par des essais de viscosimétrie. Les flaques ainsi que les perles sont des éléments indésirables dans les échafaudages. La non-homogénéité des échafaudages peut conduire à des concentrations de contraintes mécaniques locales qui peuvent conduire à la rupture de l'échafaudage. De plus, l'échafaudage doit être le plus fibrillaire possible afin de mimer la matrice extra-cellulaire. Un critère de qualité du filage, au départ arbitraire, a été mis en place afin de séparer les bons échantillons des mauvais. Un échafaudage qui possède 90 % de sa surface recouverte par des fibres est considéré comme fibreux. De ce fait, une zone optimisée définie pour des valeurs de concentration entre 4 %m et 10 %m et des diamètres

d'aiguille variant de 0,25 mm à 0,41 mm a été retenu comme base de travail pour la suite de l'étude.

À partir de ces valeurs, une étude paramétrique d'optimisation par régression multilinéaire par moindres carrés a permis de clarifier l'importance de chaque paramètre (concentration de la solution, diamètre de l'aiguille, pression de l'air, débit du pousse seringue, hauteur de pulvérisation) dans la formation des fibres. La concentration étant le paramètre prépondérant, relié majoritairement par la viscosité, il était nécessaire de faire des essais de viscosité des solutions par rhéologie rotative. Ces essais ont permis d'expliquer la formation des perles. Un régime de viscosité dilué ne permet pas l'enchevêtrement des chaînes polymériques et ainsi la formation des fibres. Les chaînes sont donc isolées dans le solvant et forment des perles. La présence de perles et de fibres dans le même échafaudage est définie par un régime semi-dilué, gamme de concentration où l'enchevêtrement n'est pas total. Un enchevêtrement total des chaînes est défini pour un régime concentré. Dans notre cas, la limite critique d'enchevêtrement, séparation entre le régime semi-dilué et concentré est située entre 4 % m et 4,5 % m. Ces valeurs permettent donc de clarifier l'utilisation d'un critère de validation de la production des échafaudages de 90 % de la surface couverte par des fibres.

La concentration est donc, de loin, le paramètre le plus significatif sur la formation des fibres et le choix de ce paramètre est primordial sur l'optimisation de la fabrication de nanofibres de polymères autres que le PLA. La viscosité des polymères, liée à la concentration, est définie par l'équation de Mark-Houwink reliant la viscosité ($[\eta]$) et la masse moléculaire (M) ($[\eta] = KM^\alpha$) où K et α sont des constantes qui dépendent du solvant et du polymère. Pour fabriquer des nanofibres de polymères différents du PLA commercial utilisé, il est nécessaire de mesurer la viscosité des solutions de polymère dissout dans un bon solvant afin de connaître la concentration critique d'enchevêtrement et donc la zone de filage appropriée. Ce principe a été appliqué tout au long de la thèse sur divers polymères :

- Le PLCL ($M_w = 100$ kDa, 65 % de L-lactide, 20 % de D-lactide et 15 % de ϵ -caprolactone) utilisé dans le chapitre V
- un PLCL utilisé dans un autre projet ($M_w = 50$ kDa, 50 % de L-lactide, 35 % de D-lactide et 15 % de ϵ -caprolactone)
- Le PLLA ($M_w = 100$ kDa, 100 % de L-lactide) utilisé dans le chapitre V
- Les 9 différents PLA-SS-Br issue d'un PDLLA utilisé dans la publication en annexe I.

Tous ces polymères ont montré un pourcentage de fibres supérieur à 90 % par rapport aux autres éléments, dans des conditions optimisées. De plus, l'étude présentée en annexe I montre l'influence de la masse moléculaire sur le filage des fibres. En effet, plus la masse est grande, plus il est facile de produire des fibres.

1.3 Compréhension de la formation des fibres lors du filage par jet d'air

D'autres groupes de recherche se sont intéressés à des systèmes similaires fonctionnant sur le même principe appelé *blow-spinning* [324], *spray-spinning* [325], *air jet spinning* [326] ou *air-brushed spinning* [327]. Ces travaux décrivent que la formation des fibres s'effectue par l'étirage d'une goutte de polymère en solution à la sortie de l'aiguille par un flux d'air laminaire. La création d'une dépression entre la sortie de l'atomiseur et la face inférieure de la goutte permet de la transformer en cône et induire l'étirage de la goutte pour pouvoir former des fibres. Cette description dépend donc de l'équilibre des forces inhérentes qui permettent de former cette goutte, de la stabiliser et de l'étirer à un diamètre contrôlé. Cependant, les études présentées dans la littérature sur les techniques de filage par jet d'air pour produire des nanofibres sont très descriptives et ne s'intéressent que peu à l'influence des paramètres sur le diamètre des fibres.

Dans les travaux de recherche décrits dans le chapitre IV, un modèle de régression multilinéaire a permis d'éclaircir les paramètres significatifs influençant le diamètre des fibres dans les conditions de concentration et de diamètre d'aiguille préalablement optimisées. Dans le modèle qui décrit le mieux le diamètre des fibres en fonction des

paramètres, seule la concentration est la seule composante linéaire. Les autres paramètres interviennent comme composante d'interaction avec la concentration ou entre le diamètre de l'aiguille et le débit. Ces paramètres ne représentent aucunement des phénomènes physiques qui permettent de former les fibres mais sont en lien avec eux. La concentration est majoritairement liée à la viscosité de la solution polymérique. De plus, la concentration intervient dans les termes d'interactions liés à la tension de surface du polymère sur l'aiguille, à la force d'étirage ou au débit en sortie de l'aiguille. Cette étude conduit donc à une meilleure description des forces mises en jeu et permet de quantifier l'influence de chaque paramètre sur le diamètre des fibres dans un cadre optimisé en vue de possibles améliorations et utilisation à grande échelle du procédé.

1.4 Evolution du système de filage par jet d'air

La première version du système de filage par jet d'air a été présentée pour la première fois en 2009 [159]. Elle comportait un système simple. Les fibres pouvaient donc être déposées sur des surfaces planes. Le système comprenait un pousse seringue et un atomiseur modifié. En 2010, le système a été pourvu d'un atomiseur plus long, d'un module, permettant de fixer et maintenir une prothèse ouverte, d'une crémaillère manuelle servant à distribuer le dépôt fibreux sur la surface de la prothèse et d'un système de pompage améliorant l'évaporation du solvant [160].

La présente thèse a permis de faire évoluer la technologie de filage par jet d'air dans une optique d'amélioration continue. Entre 2011 et 2013, le système de filage a été reconstruit et partiellement automatisé. Une glissière XY a été rajoutée afin de déposer des fibres sur des surfaces planes dont les caractéristiques de dépôt ont été partiellement optimisées (annexe V). De plus, le pousse seringue a été fixé sur une glissière verticale afin de définir soit une position fixe et précise en hauteur, soit une gamme de position variant de façon dynamique pour pouvoir déposer des fibres sur des prothèses. Le système de maintien des prothèses a été rénové et motorisé afin d'étirer le cosseage de la prothèse sans la déformer plastiquement (Figure 54). Cette étape permet de déposer des fibres de manière uniforme sur toute la surface de la prothèse. Pour ce faire, le tube textile est relié à une ailette par un

fil monté à un servomoteur asservi par un capteur optique. Le capteur définit le degré de décoselage appliqué sur la prothèse et fait osciller l'ailette entre 0° et 90° afin de tirer sur la prothèse.

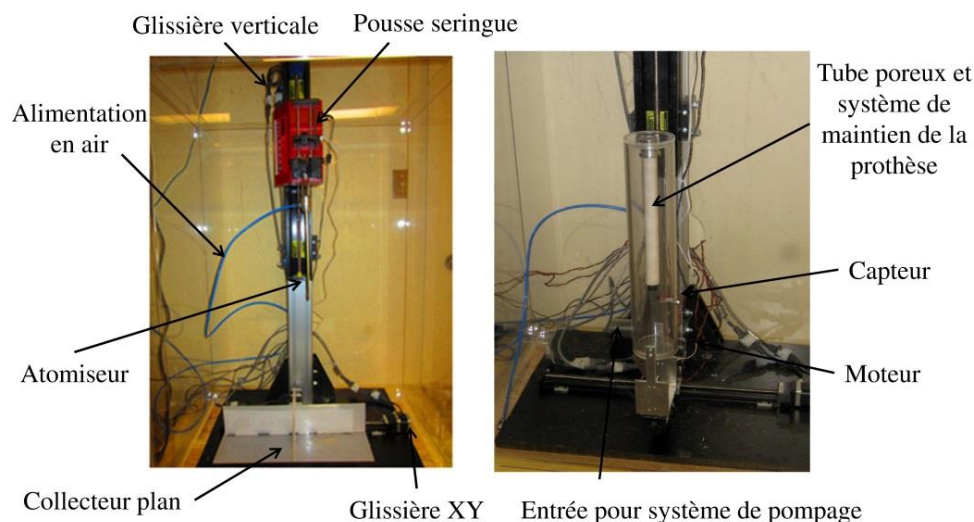


Figure 54. Système de filage par jet d'air et module de pulvérisation dans des prothèses vasculaires

Lors d'un projet annexe à cette thèse en collaboration avec le laboratoire d'organogénèse expérimentale (LOEX), nous avons été amenés à concevoir et fabriquer un système d'élaboration contrôlée d'échafaudage de nanofibres sous forme tubulaire de diamètre de 5 mm. Ce système, très répandu, se compose d'un mandrin rotatif en Téflon® monté sur la glissière XY. La vitesse du moteur du mandrin et son déplacement sont contrôlés par un potentiomètre et par la glissière (Figure 55).



Figure 55. Échafaudage tubulaire de nanofibres

1.5 Conception d'un polymère spécifique à dégradation contrôlée

Dans le domaine biomédical, la dégradation des polymères est souvent décrite comme une conséquence à l'utilisation de polymères biodégradables et non comme une caractéristique que l'on peut contrôler précisément. De plus, la conception d'un polymère dégradable amène comme toute conception de matériau à la question de l'application visée. Dans cette logique, une application spécifique nécessite la création d'un matériau particulier ; le choix du matériau ne s'est donc pas fait au hasard et a été mûrement réfléchi. Parmi les matériaux dégradables utilisés à des fins biomédicales, les polyesters aliphatiques tels que l'acide polylactique, l'acide polyglycolique et le polycaprolactone sont les plus utilisés et les mieux documentés depuis la création de fils de suture résorbable dans les années 1970 jusqu'aux stents biodégradables de ces dernières années [168]. De plus, les homopolymères de chacune de ces familles ainsi que les copolymères deux à deux tels que le poly(L-lactique-co-D-lactique) ou le poly(L-lactique-co- ϵ -caprolactone) ne sont pas appropriés pour l'application décrite dans cette thèse soit du point de vue mécanique, de la dégradation ou de la microstructure.

Le polymère présenté dans le chapitre V provient d'une nouvelle génération de terpolymère composé de L-lactide, de D-lactide et de ϵ -caprolactone. Le savant mélange de ces trois composants ainsi que la microstructure initiale et son évolution au cours de la dégradation correspond à nos attentes en termes de temps de dégradation. La formulation choisie est un PLCL avec 65 % de L-lactide, 20 % de D-lactide et 15 % de ϵ -caprolactone et coïncide avec un cahier des charges précis. Tout d'abord, l'ajout de ϵ -caprolactone aux monomères de PLA augmente considérablement ses propriétés d'élasticité et ce PLCL, considéré comme un élastomère thermoplastique, possède sensiblement les mêmes propriétés que les fibres d'élastine de la matrice extracellulaire. Le remplacement de l'octoate d'étain par des sels de bismuth comme catalyseur de la polymérisation diminue la stéréodépendance du polymère démontrée pour le PLLA dans le chapitre III. Ceci conduit à des blocs de LLA, DLA et CL de faible longueur et ne permettant pas l'organisation d'une phase cristalline avant et pendant la dégradation. La microstructure amorphe, le choix de la masse moléculaire ainsi que les ratios de chaque monomère conduisent donc à une dégradation

196

totale et sans résidus cristallins de 12 semaines à 37 °C dans une solution aqueuse (PBS). Le choix du temps de dégradation dépend des temps de néo-endothélialisation *in vivo* observé chez les animaux [309] qui est similaire aux temps nécessaires pour produire un vaisseau sanguin *in vitro* par génie tissulaire [50].

À cette étape de conception et de test, le matériau choisi ne tient pas compte de la dégradation enzymatique qui accélère inévitablement la dégradation ainsi que de la présence de cellules endothéliales ou macrophages. Du point de vue du milieu de dégradation, la matrice extra-cellulaire des cellules endothéliales est majoritairement aqueuse et connaît un renouvellement lent, sans enzymes connus pour accélérer la dégradation des polyesters. Cependant, le sang contient des estérases ou des protéinases ainsi que des macrophages produisant des enzymes diminuant le pH local et accélérant considérablement le processus d'hydrolyse. Au contraire, le dépôt possible de protéines plasmatiques lors de l'implantation diminue l'hydrolyse. Afin de répondre à cette ajustement dû au changement des conditions de dégradation, le ter-polymère de PLCL reste une plateforme intéressante et très polyvalente. En effet, il est toujours possible de changer les paramètres de polymérisation (taux de catalyseur, température de polymérisation, pourcentage des monomères, temps de polymérisation) afin d'ajuster les propriétés du PLCL [294].

1.6 Dégradation accélérée du PLLA : avantages et limites

Étant un polymère dégradé grandement utilisé dans le domaine cardiovasculaire, le PLLA est un bon matériau de comparaison afin de prouver les performances du PLCL. Dans le chapitre V de cette thèse, la comparaison entre les échantillons de films et de nanofibres de PLCL et de PLLA est faite à la même température de dégradation mais aussi au même taux de dégradation. La simulation du taux de dégradation est rendue possible par des études mettant en relation la diminution de masse moléculaire avec le temps et la température. Ces travaux ont donc permis de fixer la température de dégradation à 50 °C et le temps de dégradation à 120 jours. Les résultats de GPC ont permis de valider le concept de comparer deux matériaux en fonction de leur taux de dégradation. L'intérêt d'un tel

résultat est, de comparer les propriétés de cytotoxicité du PLLA et du PLCL avec une quantité de produit de dégradation similaire. Cependant, l'accélération de la dégradation par augmentation de la température doit être effectuée en dessous de la température de transition vitreuse afin d'éviter une cristallisation du PLLA induite par mobilité des chaînes de polymères au-dessus de la transition vitreuse. Les résultats ont montré que lors de la dégradation du PLLA la température de transition vitreuse diminuait à cause de la réduction de la longueur des chaînes au cours de la dégradation jusqu'à dépasser la température de dégradation et cristalliser le polymère au cours du processus.

1.7 Compréhension de la dégradation des nanofibres

Le PLLA et le PLCL se dégradent de façon volumique par hydrolyse simple des liaisons esters cependant la comparaison entre les échantillons ont montré des singularités. Notamment, la surface spécifique d'une fibre est largement plus grande que celle d'un film mais curieusement, les nanofibres de PLLA se dégradent moins vite que les films tandis que les nanofibres et les films de PLCL ont des taux de dégradation similaire. Les explications avancées dans le chapitre V concernent des phénomènes qui se déroulent à plusieurs échelles et ces phénomènes peuvent s'opposer dans la description de la dégradation des polymères.

Tout d'abord, les chaînes de polymère de PLLA sont sensiblement alignées les unes par rapport aux autres à l'intérieur de la fibre possédant des liaisons faibles rigides entre elles à température ambiante ou corporelle. L'alignement est caractérisé par un pic de cristallisation absent des thermogrammes de DSC qui montre la possibilité des fibres à se réorganiser en structures cristallines au-dessus de la T_g . Ce phénomène n'est pas visible dans le PLCL car le polymère est amorphe et sa microstructure ne permet pas de réarrangement. Ensuite, la présence d'un pic de relaxation irréversible montre que la forme fibreuse est métastable à cause d'un entassement des chaînes de polymère libéré pendant la transition vitreuse. Ce phénomène n'est également pas visible dans le PLCL car la température corporelle est au-dessus de la T_g ; les chaînes sont donc plus mobiles annulant ainsi l'entassement des chaînes, phénomène irréversible. Ces observations se traduisent par

une diminution de la pénétration de l'eau dans les structures entassées et ainsi une plus faible dégradation.

À l'échelle de la fibre, la cristallisation des fibres de PLLA dégradées à 50 °C induit une diminution notable du diamètre des fibres en fonction du temps de dégradation tandis que le phénomène d'entassement implique une diminution du nombre de fibre de grand diamètre sans pour autant diminuer le diamètre global de manière significative. Au contraire, l'absence de phase cristalline associée à une dégradation au-dessus de la Tg augmente l'infiltration de l'eau dans les fibres ce qui augmente le diamètre des fibres ce qui se traduit, ensuite, par une fusion des fibres entre elles.

A l'échelle de l'échafaudage, le matériau est discontinu ce qui joue un rôle sur la dégradation. En effet, l'eau pénètre facilement entre les fibres. De plus, le diamètre spécifique d'une fibre est 100 à 1000 fois plus petit que l'épaisseur d'un film. De ce fait, l'accélération de la dégradation par autocatalyse démontrée dans la littérature [288] est grandement diminuée dans les fibres par rapport aux films. Couplés à l'entassement des fibres, ces deux phénomènes sont à l'origine des mécanismes qui diffèrent la dégradation des fibres de celle des films. À l'échelle macroscopique, les fibres de PLLA, en se dégradant au cours temps, se brisent pour former un matériau poudreux. À l'inverse les fibres de PLCL fusionnent et forment un agglomérat avec des propriétés de structures comparables aux films. Ces observations sont à l'origine des propriétés de dégradation similaire entre les fibres et les films de PLCL.

Tout au long de cette thèse, des méthodes et des procédures atypiques ont été développées afin de mieux comprendre la dégradation des polymères et des nanofibres. Dans le troisième chapitre, la NMR du proton est, en général, utilisée pour caractériser les polymères après synthèse mais jamais dans le cas de la dégradation des polymères. L'utilisation de la NMR a permis de suivre les coupures de chaînes en fonction des stéréoséquences au cours de la dégradation du PLA ce qui n'avait pas été prouvé expérimentalement à notre connaissance. Dans le cinquième chapitre, l'étude de microscopie électronique à balayage et le traitement d'image a conduit à l'emploi de

nouveaux outils comme le facteur de forme et le mode. Dans les annexes II à IV, des procédures peu conventionnelles d'analyses en DSC, XRD et spectroscopie infrarouge ont été mises en œuvre dans le but de mieux comprendre l'organisation moléculaire pendant la dégradation des nanofibres, caractérisés par des mécanismes de dégradation différents par rapport aux films.

1.8 Dégradation et cytotoxicité

La dernière partie du chapitre V a pour but de savoir si le PLCL est un polymère qui pourrait concurrencer le PLLA sous forme de nanofibres ou de film du point de vue de sa cytotoxicité avec les cellules endothéliales et durant tout son cycle de dégradation. Tout d'abord, les deux polymères n'ont montré aucun effet en ce qui concerne leur cytotoxicité avant le processus de dégradation. De plus, l'adhésion et la prolifération ont été améliorées sur les surfaces de nanofibres et particulièrement sur les fibres de PLCL. Il semblerait que la pénétration rapide de l'eau dans le PLCL augmenterait l'hydrophilicité en surface. Ensuite, des tests de pH des solutions aqueuses sans PBS contenant les produits de dégradation en fonction du temps ont mis en évidence, d'une part, que le mécanisme de dégradation avait une influence sur le pH et, d'autre part, que les échantillons contenant du PLCL montrent une diminution de pH plus faible que les échantillons en PLLA. En effet, les produits de dégradation du PLCL, notamment ceux de la partie caprolactone, présentent un pH moins acide que les produits de PLLA. Les solutions contenant les produits de dégradation à différents temps de dégradation ont été par la suite mélangées avec une solution de M199, couramment utilisée comme médium de culture mais deux fois plus concentrée, avec un ratio 1 :1. Ce mélange a été placé en contact avec des cellules endothéliales et mis en incubateur à 37°C avec 5 % de CO₂. Selon toute logique, les cellules endothéliales ont démontré une plus grande sensibilité aux échantillons avec les pH les plus bas qui, pour certains, n'ont pas été contrebalancés par le pouvoir tampon de la solution de M199. Par conséquent, ce sont les échantillons cellulaires contenant les produits de dégradation du PLLA qui montrent les plus grandes sensibilités tandis que les échantillons de PLCL sont restés équivalents aux contrôles positifs pendant toute la durée

de la dégradation du matériau. Le PLCL est donc un meilleur candidat que le PLCL du point de vue, entre autres de la cytotoxicité.

1.9 Fonctionnalisation de la surface des nanofibres

Les nanofibres représentent un support synthétique souple qui permet l'adhésion et la prolifération des cellules endothéliales *in vitro*. Cependant, l'adhésion des cellules peut être grandement améliorée en modifiant les propriétés de surface des nanofibres hydrophobes. En effet, ces caractéristiques peuvent être améliorées en ajoutant une molécule hydrophile greffée de façon covalente sur la surface des nanofibres. De plus, dans un cas d'un matériau implantable, le mouillage peut induire des variations de la réponse immunitaire et donc retarder la formation de caillot sanguin. La méthode de greffage par polymérisation radicalaire par transfert d'atome induite par la surface (SI-ATRP) s'est avérée la meilleure stratégie pour notre application car ce procédé polyvalent permet de fonctionnaliser la surface des nanofibres et non la surface des échafaudages ce qui est le cas, par exemple, dans la fonctionnalisation par technologie plasma.

Des nanofibres de PLA possédant des groupements disulfure-brome (PLA-SS-Br) de fin de chaînes ont été polymérisées par ouverture de cycle et mis en forme par filage par jet d'air dans des conditions optimisées par viscosimétrie mais aussi par augmentation de la masse moléculaire. Ensuite, de l'oligo-éthylène oxyde méthacrylate (OEOMA), polymère dérivé de l'oxyde d'éthylène connu pour ses propriétés hydrophiles, a été greffé sur la surface des nanofibres par SI-ATRP. Le greffage de la fonction hydrophile sur la surface des fibres et ses performances ont été démontrés, créant ainsi une nouvelle classe de nanofibres filées par jet d'air, à la fois dégradables et fonctionnalisées. Ces résultats très prometteurs de modification de surfaces antiadhésives ouvrent la voie à la fonctionnalisation des nanofibres par des molécules bioactives.

L'étude de fonctionnalisation des nanofibres va plus loin. Les nanofibres ont été placées dans une solution réductrice de D, L-dithiothreitol (DTT) afin de cliver la liaison disulfure. Les résultats de NMR et d'angle de contact ont montré que l'OEOMA-SH a été relargué

dans la solution. De plus, les nanofibres de PLA ont de nouvelles fonctions (-SH) moins hydrophiles que l'OEOMA. Ces travaux montrent la preuve de concept qu'une molécule, comme un médicament, peut être relarguée à partir de la surface des nanofibres tout en gardant des propriétés de surface moins thrombogènes.

1.10 Adhésion des nanofibres sur les surfaces textiles

La modification de surface de la prothèse est une stratégie possible pour permettre d'améliorer l'adhésion des nanofibres à cette surface textile. En effet, en activant la surface par des traitements physico-chimiques, il est possible de créer des liaisons faibles de types Van der Waals ou pont hydrogénés entre le PET et le PLA. L'activation peut se faire par attaque chimique acide ou basique de la surface de PET, cependant, ces traitements détériorent la prothèse et peuvent causer une rupture précoce de la prothèse ou une possible contamination par les réactifs utilisés. Les traitements par plasma s'avèrent, dans ce cas, une bonne alternative notamment à pression atmosphérique. En effet, les traitements par plasma à pression atmosphérique à décharge à barrière diélectrique (APDBD) permettent un traitement plus doux que les traitements plasma à basse pression. Dans ce contexte, des traitements APDBD ont été effectués sur des films et des prothèses tissées et tricotées sous atmosphère à 5 % H₂ et 95 % N₂. Des analyses de spectroscopie photoélectronique X (XPS) ont permis d'observer la présence d'azote mais aussi d'amine (NH₂), groupement chimique responsable des liaisons faibles avec les groupements carboxyles du PLA (COOH). De plus, l'analyse par mesure de l'angle de contact a montré que le matériau était très hydrophile. Ces caractéristiques de surface prouvent l'efficacité du traitement. Les résultats présentés en annexes V varient en fonction du temps de traitement. Après optimisation du recouvrement, des nanofibres ont été pulvérisées sur des prothèses traitées par plasma et testé par dynamométrie et en chambre de flux. Ces résultats ont démontré que le traitement plasma améliorait l'adhésion des nanofibres sur les prothèses mais nécessitent des optimisations.

2. Limites et Perspectives

2.1 Amélioration de la technique de filage par jet d'air

Tout au long de cette thèse, la technique du filage par jet d'air a été améliorée pour pouvoir palier aux besoins des projets développés aux laboratoires. Cependant, le potentiel d'une telle technique n'a pas été pleinement exploité. Le dispositif actuel a été développé dans un contexte de modularité ou « prêt-à-tourner » (plug-and-play) et d'automatisation dans le but de développer ultérieurement d'autres modules pour d'autres applications. Présentement, il est possible de produire des surfaces recouvertes de nanofibres dans n'importe quel matériau (Chapitre IV), de recouvrir des dispositifs tubulaires sur la surface interne et externe de diamètre intérieur supérieure à 9 mm avec un contrôle optimisé et automatique, de recouvrir des surfaces complexes ou liquide et de fabriquer des tubes de nanofibres. Les travaux de cette thèse ont amené également au développement de procédure simple pour le filage de nombreux polymères (Chapitre IV).

La prochaine étape serait de miniaturiser le dispositif de maintien de la prothèse ainsi que l'injecteur et l'atomiseur pour permettre la pulvérisation de nanofibres sur des prothèses de diamètre inférieur à 9 mm ce qui représente un réel défi technologique. Cette étape nécessite une meilleure compréhension de la formation des fibres et des forces mises en jeu. Tout d'abord, l'utilisation de techniques optiques, par exemple par photographie Schlieren [328,329], permettrait de visualiser les flux d'air pendant la formation des fibres. Une étude mathématique et une modélisation numérique des fluides pourraient conduire à une rétroconception du dispositif afin d'optimiser les dimensions de l'atomiseur et de l'injecteur à fabriquer [330]. Il est également possible de contrôler d'autres paramètres de fabrication comme la pression environnementale ou la nature du gaz pulvérisé. En effet, une diminution de la pression faciliterait la formation des fibres et l'évaporation du solvant.

Ensuite, une autre innovation peut concerner les produits à pulvériser. Les solutions peuvent être accompagnées d'autres molécules que le polymère à dissoudre pour former des fibres composites et utilisées pour des applications spécifiques. Par exemple, les solutions de PLA peuvent être mélangées à de l'hydroxyapatite pour des applications en reconstruction osseuse [326], avec des sels d'argent pour des propriétés antibactériennes

[331]. Également, il est possible de créer des échafaudages à plusieurs composants soit en utilisant des buses avec plusieurs flux, si les solvants sont compatibles, soit en multipliant les jets [332].

Finalement, certaines applications comme la régénération nerveuse nécessitent la fabrication de fibres alignées. Ce type de fibres peut être fabriqué par l'ajout d'un module supplémentaire déjà utilisé dans le domaine du filage électrostatique appelé vortex [333]. Il s'agit de pulvériser les nanofibres dans un bassin d'eau muni d'un trou qui permettrait la création d'un flux tourbillonnaire et permettrait d'aligner les fibres.

2.2 Fabrication d'échafaudage à porosité contrôlée

La porosité des échafaudages est un paramètre crucial en génie tissulaire permettant ou non la vascularisation des organes. D'une part, une faible porosité permet d'avoir la croissance en monocouche des cellules endothéliales. D'autre part, une grande porosité est recherchée lors d'une néo-endothélialisation transmurale. Il faut donc distinguer plusieurs stratégies de néo-endothélialisation. Tout d'abord, une endothélialisation *in vitro* nécessite une porosité la plus faible possible pour éviter que les cellules puissent proliférer à l'intérieur de l'échafaudage, comme on peut le voir dans les études de prolifération sur les prothèses vasculaire textiles. Ensuite, une endothélialisation *in situ* en recrutant les EPCs dans le sang circulant nécessite également une faible porosité. Finalement, il a été démontré que l'endothélialisation transmurale constitue le mécanisme d'endothélialisation le plus efficace chez l'humain pour les prothèses en ePTFE. Cependant, ce processus nécessite un échafaudage microporeux afin de permettre la régénération des capillaires. La maîtrise de la taille des pores, de leur distribution dans l'espace et de leur interconnectivité sont des éléments essentiels afin de maîtriser l'endothélialisation transmurale [334]. Une taille micrométrique et distribuée de façon contrôlée doit être privilégiée afin de garder une prolifération des cellules endothéliales en monocouche à la surface des prothèses vasculaires.

Ces perspectives sont basées sur des travaux effectués majoritairement sur des prothèses en ePTFE. Ces matériaux, contrairement au PET ou au PLA, sont très hydrophobes, ce qui diminue considérablement l'adsorption des protéines. Dans le cas de matériaux moins hydrophobes, l'adsorption des protéines en surface, notamment la fibrine, empêche l'endothélialisation transmurale. Il est donc nécessaire de modifier la surface des nanofibres pour empêcher cette adsorption.

La maîtrise de la porosité reste un défi dans la fabrication d'échafaudages de nanofibres pour la régénération tissulaire. Des études ont montrées qu'une augmentation de l'humidité [335], de la vitesse de passage du collecteur sous la buse ou du nombre de passage (Annexe V) sont des moyens d'augmenter la porosité. Une autre technique, plus facile à maîtriser, consiste à utiliser un composant sacrificiel enchevêtré dans l'échafaudage qui peut être dissout ou dégradé. Par exemple, des perles d'oxyde d'éthylène ou de sel sont des assemblages qui se dissolvent dans l'eau et qui sont faciles à intégrer dans les échafaudages [336].

2.3 Polymères à dégradation contrôlée pour la génération tissulaire vasculaire

Au cours des travaux présentés dans cette thèse, un polymère comportant des ratios spécifiques d'acide L-lactique, d'acide D-lactique et du ϵ -caprolactone a été conçu et synthétisé à partir d'un cahier des charges pour des applications en tant que biomatériau vasculaire. Après essais, le polymère s'est comporté comme énoncé au départ cependant, les nanofibres ont fusionné probablement à cause d'une T_g trop basse couplé à une structure amorphe tout au long de la dégradation. Afin de conserver une morphologie fibreuse, il est donc nécessaire de reconcevoir un polymère avec une température de transition vitreuse ou une cristallinité plus élevée tout en gardant les mêmes performances mécaniques et d'interaction avec les cellules endothéliales au cours de sa dégradation.

Ensuite, en termes de protocole de dégradation *in vitro*, il est nécessaire de concevoir des solutions plus proches de la réalité. L'ajout de sel de Hanks ou de Ringer permettrait de voir l'importance des ions sur la dégradation. De même, l'ajout de protéase ou d'estérase,

ou la dégradation du matériau dans une solution acide permettant de simuler l'attaque des macrophages, accélérerait la dégradation en se rapprochant des conditions *in vivo*. On peut également se demander si une dégradation en chambre flux n'accélère pas aussi l'hydrolyse du polymère. Ces étapes nécessiteront également une re-conception du polymère afin de se rapprocher du polymère final qui sera implanté. De ce fait, une stratégie étape par étape aboutit à un meilleur contrôle et une meilleure connaissance des processus de dégradation des polymères surtout dans la conception de système complexe de dégradation. D'une part, ce type d'essai *in vitro* est peu cher comparé à l'étude animale et, d'autre part, l'investigation physico-chimique des matériaux est impossible après explantation à cause de la présence de protéines et de cellules à la surface du matériau.

Le développement de nouvelles procédures de caractérisation en fonction de la dégradation a permis de mieux aborder certaines problématiques liées au sujet de thèse. Le suivi des stéréo-séquences des chaînes de polymères par NMR du proton en fonction de la dégradation a permis de mieux comprendre les mécanismes de dégradation du PLA. Ces analyses, appliquées exclusivement au PLA au cours de ces travaux, peuvent être facilement transposables à des copolymères ou des polymères dégradables de natures différentes possédant des formes énantiomériques. L'analyse quantitative du diamètre des nanofibres en fonction de la dégradation développée dans le chapitre V ainsi que les procédures de caractérisation en DSC ou spectroscopie infrarouge en annexes II et IV sont d'autres exemples qui pourraient être développés pour mieux comprendre la dégradation d'autres polymères biodégradables. Finalement, la caractérisation mécanique des fibres notamment en DMA a été peu mise en valeur dans cette thèse et nécessite aussi d'être approfondie.

2.4 Créer des nanofibres dégradables et fonctionnalisées

L'article présenté en annexe I a été effectué en parallèle de cette thèse et avait pour but de modifier la surface des nanofibres par ATRP à partir d'éléments provenant de la surface avec un polymère hydrophile. Une des perspectives directes liées à cette thèse sera de développer des nanofibres à la fois dégradables et fonctionnalisées. Le premier objectif sera

de comparer l'effet de la modification de surface par des oligomères hydrophiles sur le mécanisme de dégradation ainsi que sur la cytotoxicité. Un deuxième objectif serait d'améliorer la bio-activité des échafaudages de nanofibres en comparant par exemple le greffage par ATRP [337], le greffage par traitement plasma [338] ou l'ajout des biomolécules pendant la fabrication des fibres, sur l'activité cellulaire. Ces molécules peuvent être des peptides d'adhésion RGD [129,339], de la fibronectine [130], molécules couramment utilisées au LIS, ou d'autres molécules d'intérêt. L'efficacité de ces molécules en fonction de la dégradation est une autre question qui pourrait être soulevée. Un dernier objectif serait d'utiliser les nanofibres comme un système de relargage de médicaments. En effet, les ponts disulfures utilisés afin de relarguer l'OEOMA ne peuvent être clivés qu'en présence de réducteur peu présent dans le sang. Il sera donc nécessaire d'utiliser des molécules clivables par exemple par des protéases contenues dans le sang.

2.5 Interactions cellules/ matériaux

Dans le chapitre V, des procédures ont été développées afin de caractériser la toxicité des polymères ou la sensibilité des cellules face aux polymères au cours de la dégradation pendant 4 jours d'incubation. Cependant, l'analyse présentée est préliminaire et ne permet pas de conclure sur la cytotoxicité du PLCL. De plus, l'analyse s'est portée sur les produits de dégradation étant, en effet, une des causes de toxicité. Une autre cause qui serait importante d'évaluer est l'effet de l'évolution de la morphologie et de la structure des nanofibres au cours de la dégradation sur le comportement des cellules endothéliales. Il est également nécessaire de savoir si l'endothélium sera adhérent à la prothèse une fois la dégradation terminée. Pour ce faire, il est possible de quantifier ou de marquer les cadhérines, protéines responsables de l'attachement cellules-cellules [340], et les intégrines ou la vinculine, responsables à diverses échelles de l'adhésion cellulaire [341]. De plus, des tests d'agrégation plaquettaire permettraient de garantir l'hémocompatibilité ou la quantification du facteur tissulaire ou ICAM, précédemment utilisé dans ce projet, permettrait de savoir si les cellules sont dans un état pro-thrombotique ou pro-inflammatoire [1]. Il est également important de connaître l'identité des protéines synthétisées par les cellules ou de voir les changements phénotypiques par l'expression

génique. Enfin, ces essais sur les cellules doivent être effectués dans un milieu statique et dynamique en flux pseudo-physiologique.

2.6 Essais en chambre de flux

Des essais en chambre de flux constituent une étape essentielle dans la vérification de la stabilité mécanique de la prothèse vasculaire recouverte de nanofibres mais aussi du comportement des cellules adhérees à la surface [339]. Une chambre de flux à plaque parallèle a déjà été conçue afin d'évaluer, de manière exploratoire, l'adhésion des nanofibres à des textiles (annexe V) fixées à des plots de 8 mm de diamètre mais aussi, l'adhésion des cellules endothéliales sur ces nanofibres. Cependant, afin de mieux caractériser l'adhésion des nanofibres, l'échantillon doit être de dimension plus grande dans le but de s'affranchir des forces parasites liées au système de fixation qui pourrait avoir une influence sur les résultats. Cette adhésion des fibres pourrait être évaluée soit sur 1 h, 24 h ou sur plusieurs jours, afin d'appliquer un protocole de culture cellulaire qui soit sur toute la durée de la dégradation. Ces essais de dégradation en chambre de flux permettraient de différencier la dégradation due aux forces de cisaillement de la dégradation hydrolytique où la valeur et la nature de la force de cisaillement sont également des paramètres importants dans l'évaluation de l'adhésion cellulaire ou du comportement cellulaire face à un flux pseudo-physiologique.

Plusieurs protocoles de cultures cellulaires peuvent amener des informations différentes. Tout d'abord, l'observation des cellules, après adhésion statique, pendant l'application du flux, permettrait d'estimer l'orientation des cellules. Ces essais peuvent durer de 1 h à plusieurs heures. Des essais sur plusieurs jours ou semaines permettraient d'évaluer la différence en prolifération des cellules mises dans des conditions statiques ou dynamiques mais également à détecter les protéines et leurs concentrations produites par les cellules soit par des essais d'immunofluorescence, immuno-enzymatique ELISA ou de transfert de protéines (*western blot*). Toutes ces techniques amènent à des informations différentes ; par exemple, la visualisation des filaments d'actine et leurs orientations sont possibles immunofluorescence ou la quantification de la production de de protéines responsables

d'un état pro-thrombotique ou pro-inflammatoire. Les essais en bioréacteur tubulaire sur des prothèses vasculaires seraient finalement une étape supplémentaire vers la production *in vitro* de prothèses endothélialisées.

2.7 Endothélialisation *In situ* ou *In vitro*

Ces deux stratégies d'endothélialisation ont des avantages et des inconvénients et les produits développés dans cette thèse ne sont pas spécifiquement réalisés pour l'une ou l'autre stratégie. L'avantage de l'endothélialisation des prothèses vasculaires *in situ* est que le dispositif implanté est totalement synthétique ce qui facilite l'approbation par les agences gouvernementales de régulation. Les matériaux utilisés sont en théorie bien connus par la communauté scientifique ; il reste à démontrer que le nouveau dispositif peut être implanté et que les concepts sont prouvés scientifiquement en montrant une amélioration significative par rapport à ce qui existe sur le marché. La difficulté de la stratégie *in situ* est qu'il est nécessaire de contrôler les interactions entre le matériau et les processus complexes biologiques qui surviennent lors de l'implantation du matériau. Ce type de prothèse vasculaire n'existe pas actuellement mais permettrait d'obtenir un produit simple, connu et disponible à grande échelle qui améliorerait considérablement le taux de réussite dans le cas d'un remplacement d'un vaisseau sanguin de petit diamètre.

L'avantage principal de l'endothélialisation *in vitro* est le contrôle de la formation de la monocouche de cellules endothéliales sur la surface de la prothèse en laboratoire. Une fois implantée, le résultat sera certainement meilleur que les produits existants sur le marché. Les inconvénients sont par ailleurs nombreux. Si les cellules proviennent du patient, l'opération se déroule en deux temps. De plus, le temps de culture des cellules peut être de plusieurs semaines, ce qui ne permet pas d'avoir un dispositif disponible immédiatement. La production de ces produits n'est actuellement pas standardisée et se fait généralement au cas par cas et le plus souvent les cas choisis sont particuliers. Le coût de tels produits peut également être un frein car les processus de fabrication nécessitent un savoir-faire, des moyens et des infrastructures spécifiques contrairement aux prothèses entièrement synthétiques.

La comparaison entre endothélialisation *in situ* ou *in vivo* pourrait être du point de vue des matériaux, des cellules mais aussi en termes d'implantation ou économique pour savoir dans quelle direction concentrer les efforts.

Le choix des cellules est également un paramètre clé dans les projets liés à l'ingénierie tissulaire *in vitro*. Il est possible de cultiver des cellules endothéliales adultes provenant de la veine saphène par exemple, du cordon ombilical, des cellules endothéliales progénitrices, des cellules souches multipotentes présente dans la moelle osseuse ou dans le tissu adipeux ou des cellules souches pluripotentes induites. Les cellules souches ont l'avantage de s'auto-renouveler ce qui facilite et accélère la culture cellulaire. Il est possible, par exemple, de recouvrir l'échafaudage de nanofibre de cellules souches et d'effectuer la différenciation *in vitro* ou de laisser les cellules se différencier *in vivo* et d'évaluer le bénéfice des différents concepts [150].

2.8 Implantation

Les travaux et les concepts développés dans cette thèse doivent être entérinés par des implantations animales. En effet, ce type d'expérimentation est nécessaire dans les phases de validation des nouveaux dispositifs médicaux et permettrait de distinguer la stratégie proposée. Tout d'abord, une implantation sous-cutanée des textiles chez la souris ou le rat serait un premier pas pour tester la réaction inflammatoire des recouvrements de nanofibres. Par exemple, la comparaison entre le textile d'une prothèse, les nanofibres et les nanofibres fonctionnalisés permettrait de faire un bilan sur le bénéfice d'utiliser des nanofibres fonctionnalisés ou non sur la réaction inflammatoire. Ces études permettraient également d'avoir une première idée sur le taux de dégradation de nanofibres *in vivo*.

Ensuite, une implantation d'une prothèse recouverte de nanofibres chez un animal comme le chien, où l'endothélialisation est dite spontanée, approuverait l'endothélialisation en monocouche des prothèses vasculaires *in situ*. De plus, ce type d'expérience permettrait d'observer si l'endothélium formé adhère à la prothèse après la dégradation des nanofibres. Une implantation chez le rat en utilisant les derniers modèles de prothèses blouclées [107]

permettrait de savoir si l'endothélialisation transmurale est possible . Une implantation chez des animaux comme le cochon ou la brebis serait une étape supplémentaire de l'étude de faisabilité à la validation du produit avant de passer en phase d'industrialisation. Ce type d'étude comparerait l'endothélialisation *in vitro* ou *in situ* ou permettrait également d'observer le bénéfice de la fonctionnalisation des prothèses vasculaires. Ces processus sont extrêmement coûteux notamment dans les opérations de chirurgie et de garde des animaux, ce qui pourrait être un obstacle à l'avancement de tout projet dans la conception de nouveaux dispositifs médicaux.

2.9 Vers d'autres applications

Les concepts développés dans cette thèse répondent à un besoin en ingénierie biomédicale et tissulaire dans le domaine vasculaire. Néanmoins, les problématiques de régénération tissulaire sont très similaires dans la reconstruction ou la régénération osseuse, nerveuse, de la trachée, des organes viscéraux, de la peau ou du cœur. Ces autres applications ont les mêmes besoins c'est-à-dire une structure qui permet la prolifération cellulaire et la formation d'un tissu, des signaux mécaniques ou biochimiques et des cellules mis en culture *in vitro* ou proliférant *in vivo*. Le concept d'échafaudages de nanofibres est bien connu cependant la fonction de dégradation contrôlée dans les nanofibres, excepté dans cette thèse, n'a jamais véritablement été étudié et amènerait un bénéfice important dans la création de nouveaux dispositifs médicaux.

Conclusion générale

De manière générale, ce projet de doctorat a abouti à la conception et la caractérisation de nouvelles nanofibres dégradables comme matériau alternatif à l'acide poly-lactique pour l'amélioration des biomatériaux vasculaires. Tout d'abord, une étude de NMR du proton a permis de mettre en évidence la dépendance de la stéréochimie du PLA durant sa dégradation. Cependant, le PLA se dégrade trop lentement notamment à cause de sa cristallinité. De plus, des études précédentes ont démontré que cette cristallinité conduit à une plus grande sensibilité des cellules. Afin de fabriquer des nanofibres se dégradant de manière contrôlée et adéquate, la technique du filage par jet d'air, utilisé pour recouvrir des prothèses vasculaires par des nanofibres de PLA, a été évaluée afin de concevoir des échafaudages de nanofibres optimisées de PLA mais aussi d'autres polymères. Cette étude a permis de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu lors de la fabrication des nanofibres dans le but de mieux appréhender de futures améliorations ou une utilisation à grande échelle du système de filages. Finalement, un terpolymère de poly(lactide-co-ε-caprolactone) a été conçu dans le but d'être fabriqué sous forme de nanofibres et d'être utilisé pour recouvrir les prothèses vasculaires et être endothélialisées. La caractérisation de ce matériau durant sa dégradation a montré qu'il pouvait être un excellent candidat pour cette application et une alternative au PLLA du point de vue de son mécanisme de dégradation mais aussi de sa cytotoxicité. En plus d'avoir répondu à beaucoup de questions concernant la conception et la dégradation de polymères dans les domaines des biomatériaux, ce projet de doctorat ouvre la voie à la mise en œuvre d'une plateforme à base de nanofibres polyvalentes à dégradation contrôlée pour des applications biomédicales.

Bibliographie

- [1] François S. Optimisation de la structure textile des prothèses vasculaires pour un développement en monocouche des cellules endothéliales. 2009.
- [2] Sabbatier G, Levesque L, Leroy M, Montaña V, Cloutier M, Loy C, et al. Advanced materials for biomedical applications. In: Gruyter D, editor. *Fonct. Mater.*, 2014, p. 227–331.
- [3] Larrañaga A, Guay-Bégin A-A, Chevallier P, Sabbatier G, Fernández J, Laroche G, et al. Grafting of a model protein on lactide and caprolactone based biodegradable films for biomedical applications. *Biomatter* 2014;4:e27979.
- [4] Silbernagl S, Despopoulos A. 4. Sang. *Atlas poche Physiol.* (4 Éd.), Flammarion; 2008.
- [5] Wetzel B, Schaefer H. Cellules sanguines au microscope électronique. *Natl Cancer Inst* 1982;<http://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imagei>.
- [6] Cosson A, Soulier J-P. Sang. *Universalis* 2011.
- [7] Verdonck P, Verhoeven R, Rieu R. Cardiovascular fluid dynamics: principles and clinical applications. *Universiteit Gend*; 1994.
- [8] Marieb EM, Hoehn K. Chapter 19: The Cardiovascular System-Blood Vessel. *Hum. Anat. Physiol.* 7th Ed., Benjamin Cummings; 2007.
- [9] Schulze-Bauer C a J, Regitnig P, Holzapfel G a. Mechanics of the human femoral adventitia including the high-pressure response. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 2002;282:H2427–40.
- [10] Gingras M, Farand P, Safar ME, Plante GE. Adventitia: the vital wall of conduit arteries. *J Am Soc Hypertens* 2009;3:166–83.

- [11] Clark JM, Glagov S. Transmural organization of the arterial media. The lamellar unit revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1985;5:19–34.
- [12] Farand P, Garon A, Plante GE. Structure of large arteries: Orientation of elastin in rabbit aortic internal elastic lamina and in the elastic lamellae of aortic media. *Microvasc Res* 2007;73:95–9.
- [13] Lebleu VS, Macdonald B, Kalluri R. Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med* 2007;232:1121–9.
- [14] Fox SI. *Human Physiology* 4th edition. Dubuque. W.C. Brown; 1993.
- [15] Whitmore RL. The flow behaviour of blood in the circulation. *Nature* 1967;215:123–6.
- [16] Nerem RM, Alexander RW, Chappell DC, Medford RM, Varner SE, Taylor WR. The study of the influence of flow on vascular endothelial biology. *Am J Med Sci* 1998;316:169–75.
- [17] Schoen FJ, Mitchell RN. Chapter II.1.5 - Tissues, the Extracellular Matrix, and Cell–Biomaterial Interactions. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, BS (Third E, editors. *Biomater. Sci. (Third Ed. An Introd. to Mater. Med., Academic Press; 2013, p. 452–74.*
- [18] Maynes R. *Structure and function of collagen types*. Elsevier; 2012.
- [19] Hiroshi Y, Evans FG. *Strenght of biological materials*. Williams &. Baltimore: 1970.
- [20] Silbernagl S, Despopoulos A. 8. Coeur et circulation. *Atlas poche Physiol.* (4 Éd.), Flammarion; 2008.

- [21] Couffinhal T, Dufourcq P, Daret D, Duplaà C. Les mécanismes de l'angiogenèse. Applications médicales et thérapeutiques. *La Rev Médecine Interne* 2001;22:1064–82.
- [22] Ema M, Rossant J. Cell Fate Decisions in Early Blood Vessel Formation. *Trends Cardiovasc Med* 2003;13:254–9.
- [23] Suburo AM, D'Amore PA. Development of the endothelium. *Vasc. Endothel. I*, vol. 2, Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2006, p. 71–105.
- [24] Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort M a MJ, oude Egbrink MG a. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Eur J Physiol* 2007;454:345–59.
- [25] Dardik A, Chen L, Frattini J, Asada H, Aziz F, Kudo F a, et al. Differential effects of orbital and laminar shear stress on endothelial cells. *J Vasc Surg* 2005;41:869–80.
- [26] Hayoz D, Silacci P. Biologie de la cellule endothéliale, apport des modèles expérimentaux. *Sang, Thromb Vaiss* 2006;18:318–24.
- [27] Busse R, Fleming I. Vascular endothelium and blood flow. In: Montana S, Higgs A, editors. *Vasc. Endothel. II*, Springer-Verlag; 2006, p. 43–78.
- [28] Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1215–25.
- [29] Arnout J, Hoylaerts MF, Lijnen HR. Haemostasis. In: Montana S, Higgs A, editors. *Vasc. Endothel. II*, Springer-Verlag; 2006, p. 1–41.
- [30] Becker BF, Heindl B, Kupatt C, Zahler S. Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol* 2000;89:160–7.

- [31] Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1015–22.
- [32] Gorbet MB, Sefton M V. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials* 2004;25:5681–703.
- [33] Tassiopoulos AK, P. Greisler H. Angiogenic mechanisms of endothelialization of cardiovascular implants: a review of recent investigative strategies. *J Biomater Sci Polym Ed* 2000;11:1275–84.
- [34] Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 2005;9:777–94.
- [35] Gale NW, Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev* 1999;13:1055–66.
- [36] Huynh-do U. Angiogenèse et anti-angiogenèse : les deux visages de la néovascularisation. *Forum Med Suisse* 2006;6:763–8.
- [37] Le Ricousse-roussanne S. Les cellules endothéliales circulantes comme biomarqueurs de l'angiogenèse et de l'efficacité des thérapies. *VEGF Actu* 2006;1:3–5.
- [38] Sabatier F, Lacroix R, Camoin-Jau L, Anfosso F, Sampol J, Dignat-George F. Cellules endothéliales circulantes, microparticules et progéniteurs : vers la définition de la « vasculocompétence ». *La Rev Médecine Interne* 2011;32:54–63.
- [39] Del Papa N, Colombo G, Fracchiolla N, Moronetti LM, Ingegnoli F, Maglione W, et al. Circulating endothelial cells as a marker of ongoing vascular disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2004;50:1296–304.

- [40] Goon PKY, Boos CJ, Stonelake PS, Blann AD, Lip GYH. Detection and quantification of mature circulating endothelial cells using flow cytometry and immunomagnetic beads: A methodological comparison. *Nat Med* 2006;45–52.
- [41] Morel O, Toti F, Morel N, Freyssinet J-M. Microparticles in endothelial cell and vascular homeostasis: are they really noxious? *Haematologica* 2009;94:313–7.
- [42] Murphy C, Kanaganayagam GS, Jiang B, Chowienczyk PJ, Zbinden R, Saha M, et al. Vascular dysfunction and reduced circulating endothelial progenitor cells in young healthy UK South Asian men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:936–42.
- [43] Bonello L, Basire A, Sabatier F, Paganelli F, Dignat-George F. Endothelial injury induced by coronary angioplasty triggers mobilization of endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease. *J Thromb Haemost* 2006;4:979–81.
- [44] Thubrikar MJ. Atherosclerosis I. *Vasc. Mech. Pathol. SE - 1*, Springer US; 2007, p. 1–19.
- [45] OMS. Statistiques sanitaires mondiales 2014. 2014.
- [46] OMS. Principales causes de mortalité dans le monde. Évolution enregistrée entre 2000 et 2012. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/fr/> n.d.:1.
- [47] Pepine CJ. The effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial dysfunction: Potential role in myocardial ischemia. *Am J Cardiol* 1998;82:S23–7.
- [48] Thubrikar MJ. Atherosclerosis II. *Vasc. Mech. Pathol. SE - 2*, Springer US; 2007, p. 20–44.
- [49] Chaouch W. Contribution à l'étude du vieillissement des prothèses vasculaires textiles en polyester. 2009.

- [50] Seifu DG, Purnama A, Mequanint K, Mantovani D. Small-diameter vascular tissue engineering. *Nat Rev Cardiol* 2013;10:410–21.
- [51] Ratner BD. A History of Biomaterials. In: Lemons BDRSHJSEBT-BS (Third E, editor. *Biomater. Sci. (Third Ed. An Introd. to Mater. Med., Academic Press; 2013, p. xli – liii.*
- [52] Mani G, Feldman MD, Patel D, Agrawal CM. Coronary stents: a materials perspective. *Biomaterials* 2007;28:1689–710.
- [53] Iqbal J, Onuma Y, Ormiston J, Abizaid A, Waksman R, Serruys P. Bioresorbable scaffolds: rationale, current status, challenges, and future. *Eur Heart J* 2014;35:765–76.
- [54] Moravej M, Mantovani D. Biodegradable metals for cardiovascular stent application: interests and new opportunities. *Int J Mol Sci* 2011;12:4250–70.
- [55] J.Kunlin. Le traitement de l'arterite obliterante par la greffe veineuse. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1949;42:371–2.
- [56] Schulman ML, Badhey MR, Yatco R. Superficial femoral-popliteal veins and reversed saphenous veins as primary femoropopliteal bypass grafts : A randomized comparative study. *J Vasc Surg* 1987;6:1–10.
- [57] Natali J. Jacques Oudot and His Contribution to Surgery of the Aortic Bifurcation. *Ann Vasc Surg* 1952;6:185–92.
- [58] Rosenberg N. The modified bovine arterial graft. *Arch Surg* 1972;105:547–8.
- [59] Raithel D, Schweiger H. The Dardik biograft in reconstructive arterial surgery: Report on a five-year experience in 94 cases. *World J Surg* 1984;8:113–6.

- [60] Chakfé N, Dieval F, Thaveau F, Rinckenbach S, Hassani O, Camelot G, et al. Vascular graft prosthesis. *Ann Chir* 2004;129:301–9.
- [61] Voohrees JR AB, Jaretzki III A, Blakemore AH. The use of tubes constructed from vinyon “N” cloth in bridging arterial defects. *Ann Surg* 1952;135:332–6.
- [62] Blakemore AH, Voohrees AB. The use of tubes constructed from vinyon “n” cloth in bridging arterial defects-experimental and clinical. *Ann Surg* 1954;140:324–33.
- [63] Harrison JH. Synthetic materials as vascular prostheses: II. A comparative study of nylon, dacron, orlon, ivalon sponge and teflon in large blood vessels with tensile strength studies. *Am J Surg* 1958;95:16–24.
- [64] Santerre JP, Woodhouse K, Laroche G, Labow RS. Understanding the biodegradation of polyurethanes: from classical implants to tissue engineering materials. *Biomaterials* 2005;26:7457–70.
- [65] Zhang Z, Marois Y, Guidoin RG, Bull P, Marois M, How T, et al. Vascugraft® polyurethane arterial prosthesis as femoro-popliteal and femoro-peroneal bypasses in humans: pathological, structural and chemical analyses of four excised grafts. *Biomaterials* 1997;18:113–24.
- [66] Xue L, Greisler HP. Biomaterials in the development and future of vascular grafts. *J Vasc Surg* 2003;37:472–80.
- [67] Zilla P, Bezuidenhout D, Human P. Prosthetic vascular grafts: wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials* 2007;28:5009–27.
- [68] DeBakey ME. Clinical application of a new flexible knitted Dacron arterial substitute. *Am Surg* 2008;74:387.

- [69] Devine C, Hons BA, McCollum C. Heparin-bonded Dacron or polytetrafluoroethylene for femoropopliteal bypass grafting: A multicenter trial. *J Vasc Surg* 2001;33:533–9.
- [70] Twine C., Mclain A. Graft type for femoro-popliteal bypass surgery. *Cochrane Libr* 2010.
- [71] Lambert AW, Fox AD, Williams DJ, Horrocks M, Budd JS. Experience with heparin-bonded collagen-coated grafts for infrainguinal bypass. *Vascular* 1999;7:491–4.
- [72] Kapadia MR, Popowich D a, Kibbe MR. Modified prosthetic vascular conduits. *Circulation* 2008;117:1873–82.
- [73] Khoffi F, Dieval F, Chakfé N, Durand B. A development of a technique for measuring the compliance of the textile vascular prostheses. *Phys Procedia* 2011;21:234–9.
- [74] Williams DF. *The Williams dictionary of biomaterials*. Liverpool University Press; 1999.
- [75] Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. Introduction - Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor. In: Lemons BDRSHJSEBT-BS (Third E, editor. *Biomater. Sci. (Third Ed. An Introd. to Mater. Med., Academic Press; 2013, p. xxv – xxxix*.
- [76] Anderson JM. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res* 2001;31:81–110.
- [77] Ratner BD, Bryant SJ. Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annu Rev Biomed Eng* 2004;6:41–75.

- [78] Vroman L, Adams AL, Fischer GC, Munoz PC. Interaction of High Molecular Weight Fibrinogen in Plasma Kininogen, Factor XI, and Fibrinogen in Plasma at Interfaces. *Blood* 1980;55:156–9.
- [79] Hanson SR, Tucker EI. Chapter II.2.6 - Blood Coagulation and Blood–Materials Interactions. In: Lemons BDRSHJSEBT-BS (Third E, editor. *Biomater. Sci.* (Third Ed. *An Introd. to Mater. Med.*, Academic Press; 2013, p. 551–7.
- [80] Salacinski HJ, Goldner S, Giudiceandrea A, Hamilton G, Seifalian AM, Edwards A, et al. The Mechanical Behavior of Vascular Grafts: A Review. *J Biomater Appl* 2001;15:241–78.
- [81] Bassiouny HS, White SS, Glagov SS, Choi ES, Giddens DP, Zarins CK. Anastomotic intimal hyperplasia: Mechanical injury or flow induced. *J Vasc Surg* 1992;15:0708–17.
- [82] Clowes AW, Clowes MM, Fingerle J, Reidy MA. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. V. Role of acute distension in the induction of smooth muscle proliferation. *Lab Invest* 1989;60:360–4.
- [83] Newby a C, Zaltsman a B. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol* 2000;190:300–9.
- [84] Ao PY, Hawthorne WJ, Vicaretti M, Fletcher JP. Development of intimal hyperplasia in six different vascular prostheses. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;20:241–9.
- [85] Pogorzelski R, Fiszer P, Toutouchi S, Szostek MM, Krajewska E, Jakuczun W, et al. Anastomotic aneurysms after arterial reconstructive operations – literature review. *Przegląd Chir* 2014;86:48–56.

- [86] Khoffi F. Contribution a l'étude de la compliance et du vieillissement des protheses arterielles. 2012.
- [87] Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 2008;20:86–100.
- [88] Florence Dieval. Étude du vieillissement physique et chimique des prothèses vasculaires. 2006.
- [89] Legout L, D'Elia P V, Sarraz-Bournet B, Haulon S, Meybeck A, Senneville E, et al. Diagnosis and management of prosthetic vascular graft infections. *Médecine Mal Infect* 2012;42:102–9.
- [90] Conte MS. The ideal small arterial substitute : a search for the Holy Grail ? *FASEB* 1998;12:43–5.
- [91] Teebken OE, Haverich A. Tissue engineering of small diameter vascular grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002;23:475–85.
- [92] Hensten A, Jacobsen N. Chapter II.2.5 - Systemic Toxicity and Hypersensitivity. In: Lemons BDRSHJSEBT-BS (Third E, editor. *Biomater. Sci. (Third Ed. An Introd. to Mater. Med., Academic Press; 2013, p. 545–51.*
- [93] Schoen FJ. Chapter II.2.7 - Tumors Associated with Biomaterials and Implants. In: Lemons BDRSHJSEBT-BS (Third E, editor. *Biomater. Sci. (Third Ed. An Introd. to Mater. Med., Academic Press; 2013, p. 558–65.*
- [94] Raab M, Swift J, Dingal PCDP, Shah P, Shin JW, Discher DE. Crawling from soft to stiff matrix polarizes the cytoskeleton and phosphoregulates myosin-II heavy chain. *J Cell Biol* 2012;199:669–83.
- [95] Lambert B, Martin J. Chapter III.1.2 - Sterilization of Implants and Devices. In: Lemons BDRSHJSEBT-BS (Third E, editor., *Academic Press; 2013, p. 1339–53.*

- [96] Berger K, Sauvage LR, Alloju M, Rao MD, Wood S. Healing of Arterial Prostheses in Man : Its Incompleteness. *Ann Surg* 1972;175:118–27.
- [97] Naito Y, Shinoka T, Duncan D, Hibino N, Solomon D, Cleary M, et al. Vascular tissue engineering: towards the next generation vascular grafts. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;63:312–23.
- [98] Clowes AW, Kirkman TR, Reidy MA. Mechanisms of Arterial Graft Rapid Transmural Capillary Ingrowth Provides a Source of Intimal Endothelium and Smooth Muscle in Porous PTFE Prostheses. *Am J Pathol* 1985;123:220–30.
- [99] Edelman ER. Vascular Tissue Engineering: Designer Arteries. *Circ Res* 1999;85:1115–7.
- [100] Sauvage LR, Berger K, Beilin LB, Smith JC, Wood SJ, Mansfield PB. Presence of Endothelium in an Axillary-femoral Graft of Knitted Dacron With an External Velour Surface. *Ann Surg* 1975;182:749–53.
- [101] Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, et al. Evidence for Circulating Bone Marrow-Derived Endothelial Cells. *Blood* 1998;92:362–7.
- [102] Asahara T. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science* (80-) 1997;275:964–6.
- [103] Nehls V, Herrmann R. The Configuration of Fibrin Clots Determines Capillary Morphogenesis and Endothelial Cell Migration. *Microvasc Res* 1996;51:347–64.
- [104] Malka D, Mendiboure J, Adenis A, Boucher E, Pierga J-Y, Conroy T, et al. Monitoring des cellules endothéliales circulantes en première ligne de traitement du cancer colorectal métastatique par chimiothérapie plus bevacizumab : résultats préliminaires de l'essai de phase II randomisé FNCLCC ACCORD 13 / 0503. *Journées Francoph. d'Hépto-gastroentérologie d'Oncologie Dig.*, 2010, p. 1.

- [105] Herring MB, Dilley R, Jersild RA, Boxer L, Gardner A, Glover J. Seeding arterial prostheses with vascular endothelium. The nature of the lining. *Ann Surg* 1979;190:84–90.
- [106] Newman AC, Nakatsu MN, Chou W, Gershon PD, Hughes CCW. The requirement for fibroblasts in angiogenesis: fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation. *Mol Biol Cell* 2011;22:3791–800.
- [107] Pennel T, Zilla P, Bezuidenhout D. Differentiating transmural from transanastomotic prosthetic graft endothelialization through an isolation loop-graft model. *J Vasc Surg* 2013;58:1053–61.
- [108] Pennel T, Fercana G, Bezuidenhout D, Simionescu A, Chuang TH, Zilla P, et al. The performance of cross-linked acellular arterial scaffolds as vascular grafts; pre-clinical testing in direct and isolation loop circulatory models. *Biomaterials* 2014;35:6311–22.
- [109] Ratner BD, Hoffman AS. Chapter I.2.12 - Physicochemical Surface Modification of Materials Used in Medicine. In: Lemons BDRSHJSEBT-BS (Third E, editor. *Biomater. Sci.* (Third Ed. An Introd. to Mater. Med., Academic Press; 2013, p. 259–76.
- [110] Hoffman AS, Hubbell JA. Chapter I.2.17 - Surface-Immobilized Biomolecules. In: Lemons BDRSHJSEBT-BS (Third E, editor. *Biomater. Sci.* (Third Ed. An Introd. to Mater. Med., Academic Press; 2013, p. 339–49.
- [111] Friedrich J. Mechanisms of Plasma Polymerization – Reviewed from a Chemical Point of View. *Plasma Process Polym* 2011;8:783–802.
- [112] Surmenev R a. A review of plasma-assisted methods for calcium phosphate-based coatings fabrication. *Surf Coatings Technol* 2011;206:2035–56.

- [113] Winters HF, Coburn JW. Surface science aspects of etching reactions. *Surf Sci Rep* 1992;14:162–269.
- [114] Desmet T, Morent R, De Geyter N, Leys C, Schacht E, Dubruel P. Nonthermal plasma technology as a versatile strategy for polymeric biomaterials surface modification: a review. *Biomacromolecules* 2009;10:2351–78.
- [115] Chu PK, Chen JY, Wang LP, Huang N. Plasma-surface modification of biomaterials. *Mater Sci Eng R* 2002;36:143–206.
- [116] Li CY, Xu FJ, Yang WT. Simple strategy to functionalize polymeric substrates via surface-initiated ATRP for biomedical applications. *Langmuir* 2013;29:1541–50.
- [117] Xu FJ, Neoh KG, Kang ET. Bioactive surfaces and biomaterials via atom transfer radical polymerization. *Prog Polym Sci* 2009;34:719–61.
- [118] Wang J-S, Matyjaszewski K. Controlled/“living” radical polymerization. atom transfer radical polymerization in the presence of transition-metal complexes. *J Am Chem Soc* 1995;117:5614–5.
- [119] Zalipsky S. Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules. *Adv Drug Deliv Rev* 1995;16:157–82.
- [120] Chupa JM, Foster AM, Sumner SR, Madhally S V, Matthew HWT. Vascular cell responses to polysaccharide materials: in vitro and in vivo evaluations. *Biomaterials* 2000;21:2315–22.
- [121] Massia SP, Stark J, Letbetter DS. Surface-immobilized dextran limits cell adhesion and spreading. *Biomaterials* 2000;21:2253–61.
- [122] Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int J Food Microbiol* 2010;144:51–63.

- [123] Yoneyama T, Sugihara K, Ishihara K, Iwasaki Y, Nakabayashi N. The vascular prosthesis without pseudointima prepared by antithrombogenic phospholipid polymer. *Biomaterials* 2002;23:1455–9.
- [124] Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987;330:1057–8.
- [125] Favia P. Plasma deposited coatings for biomedical materials and devices: Fluorocarbon and PEO-like coatings. *Surf Coatings Technol* 2012;211:50–6.
- [126] Avci-Adali M, Ziemer G, Wendel HP. Induction of EPC homing on biofunctionalized vascular grafts for rapid in vivo self-endothelialization-a review of current strategies. *Biotechnol Adv* 2010;28:119–29.
- [127] De Mel A, Jell G, Stevens MM, Seifalian AM. Biofunctionalization of biomaterials for accelerated in situ endothelialization: a review. *Biomacromolecules* 2008;9:2969–79.
- [128] Gagné L, Rivera G, Laroche G. Micropatterning with aerosols: application for biomaterials. *Biomaterials* 2006;27:5430–9.
- [129] Boivin M-C, Chevallier P, Hoesli CA, Lagueux J, Bareille R, Rémy M, et al. Human saphenous vein endothelial cell adhesion and expansion on micropatterned polytetrafluoroethylene. *J Biomed Mater Res A* 2013;101:694–703.
- [130] Vallières K, Petitclerc É, Laroche G. Covalent Grafting of Fibronectin onto Plasma-Treated PTFE: Influence of the Conjugation Strategy on Fibronectin Biological Activity. *Macromol Biosci* 2007;7:738–45.
- [131] Preissner KT, Reuning U. Vitronectin in vascular context: facets of a multitasking matricellular protein. *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 37, © Thieme Medical Publishers; 2011, p. 408–24.

- [132] Williams SK, Kleinert LB, Patula-Steinbrenner V. Accelerated neovascularization and endothelialization of vascular grafts promoted by covalently bound laminin type 1. *J Biomed Mater Res Part A* 2011;99A:67–73.
- [133] Vallières K, Chevallier P, Sarra-Bournet C, Turgeon S, Laroche G. AFM Imaging of Immobilized Fibronectin: Does the Surface Conjugation Scheme Affect the Protein Orientation/Conformation? *Langmuir* 2007;23:9745–51.
- [134] Randone B, Cavallaro G, Polistena a, Cucina a, Coluccia P, Graziano P, et al. Dual role of VEGF in pretreated experimental ePTFE arterial grafts. *J Surg Res* 2005;127:70–9.
- [135] Poh CK, Shi Z, Lim TY, Neoh KG, Wang W. The effect of VEGF functionalization of titanium on endothelial cells in vitro. *Biomaterials* 2010;31:1578–85.
- [136] Yun Y-R, Won JE, Jeon E, Lee S, Kang W, Jo H, et al. Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. *J Tissue Eng* 2010;2010:218142.
- [137] Nerem RM. Tissue Engineering: The Hope, the Hype, and the Future. *Tissue Eng* 2006;12:1143–50.
- [138] Sarkar D, Zhao W, Schaefer S, Ankrum JA, Teo GSL, Pereira MN, et al. Chapter II.6.2 - Overview of Tissue Engineering Concepts and Applications. In: Lemons BDRSHJSEBT-BS (Third E, editor. *Biomater. Sci. (Third Ed. An Introd. to Mater. Med., Academic Press; 2013, p. 1122–37.*
- [139] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Sci* 1993;260 :920–6.
- [140] Peck M, Gebhart D, Dusserre N, McAllister TN, L’Heureux N. The evolution of vascular tissue engineering and current state of the art. *Cells Tissues Organs* 2012;195:144–58.

- [141] L'heureux N, Pâquet S, Labbé R, Germain L, Auger FA. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J* 1998;12:47–56.
- [142] Wystrychowski W, McAllister TN, Zagalski K, Dusserre N, Cierpka L, L'heureux N. First human use of an allogeneic tissue-engineered vascular graft for hemodialysis access. *J Vasc Surg* 2014;60:1–5.
- [143] Syedain ZH, Meier LA, Lahti MT, Johnson SL, Tranquillo RT. Implantation of completely biological engineered grafts following decellularization into the sheep femoral artery. *Tissue Eng Part A* 2014;20:1726.
- [144] Huang AH, Niklason LE. Engineering of arteries in vitro. *Cell Mol Life Sci* 2014;71:2103–18.
- [145] Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Houser S, Marini R, et al. Functional Arteries Grown in Vitro. *Sci* 1999;284 :489–93.
- [146] Hasan A, Memic A, Annabi N, Hossain M, Paul A, Dokmeci MR, et al. Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts. *Acta Biomater* 2014;10:11–25.
- [147] Roh JD, Nelson GN, Brennan MP, Mirensky TL, Yi T, Hazlett T, et al. Small-diameter biodegradable scaffolds for functional vascular tissue engineering in the mouse model. *Biomaterials* 2008;29:1454–63.
- [148] Roh JD, Sawh-Martinez R, Brennan MP, Jay SM, Devine L, Rao D a, et al. Tissue-engineered vascular grafts transform into mature blood vessels via an inflammation-mediated process of vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:4669–74.
- [149] Poh M, Boyer M, Solan A, Dahl SLM, Pedrotty D, Banik SSR, et al. Blood vessels engineered from human cells. *Lancet* 18AD;365:2122–4.

- [150] Bajpai VK, Andreadis ST. Stem cell sources for vascular tissue engineering and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2012;18:405–25.
- [151] Villalona GA, Udelsman B, Duncan DR, McGillicuddy E, Sawh-martinez RF, Hibino N, et al. Cell-Seeding Techniques in Vascular Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16:341–50.
- [152] Li S, Sengupta D, Chien S. Vascular tissue engineering: from in vitro to in situ. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2014;6:61–76.
- [153] Maxson S, Orr D, Burg KLJL. Bioreactors for Tissue Engineering. *Tissue Eng SE - 10* 2011:179–97.
- [154] Ruel J, Lachance G. A New Bioreactor for the Development of Tissue-Engineered Heart Valves. *Ann Biomed Eng* 2009;37:674–81.
- [155] Bordenave L, Villars S, Daculsi R, Midy D. In vitro endothelialized ePTFE prostheses : Clinical update 20 years after the first realization. *Clin Hemorheol Microcirc* 2005;33:227–34.
- [156] Deutsch M, Meinhart J, Zilla P, Howanietz N, Gorlitzer M, Froeschl A, et al. Long-term experience in autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts. *J Vasc Surg* 2009;49:352–62; discussion 362.
- [157] Thebaud NB, Bareille R, Remy M, Bourget C, Daculsi R, Bordenave L. Human progenitor-derived endothelial cells vs. venous endothelial cells for vascular tissue engineering: an in vitro study. *J Tissue Eng Regen Med* 2010;4:473–84.
- [158] François S, Chakfé N, Durand B, Laroche G. Effect of polyester prosthesis micro-texture on endothelial cell adhesion and proliferation. *Trends Biomater Artif Organs* 2008;2:93–103.

- [159] François S, Chakfé N, Durand B, Laroche G. A poly(l-lactic acid) nanofibre mesh scaffold for endothelial cells on vascular prostheses. *Acta Biomater* 2009;5:2418–28.
- [160] François S, Sarra-Bournet C, Jaffre A, Chakfé N, Durand B, Laroche G. Characterization of an air-spun poly (L-lactic acid) nanofiber mesh. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 2010;93:531–43.
- [161] Ramakrishna S, Fujihara K, Teo W-E, Lim T-C, Ma Z. An introduction to electrospinning and nanofibers. World Scientific; 2005.
- [162] Sun D, Chang C, Lin L. Near-field electrospinning. *Nano Lett* 2006;6:839.
- [163] Zhang C, Yuan X, Wu L, Han Y, Sheng J. Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. *Eur Polym J* 2005;41:423–32.
- [164] Fong H, Chun I, Reneker DH. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer (Guildf)* 1999;40:4585–92.
- [165] Scott G. Photo-biodegradable plastics: Their role in the protection of the environment. *Polym Degrad Stab* 1990;29:135–54.
- [166] Shalaby SW. Radiative degradation of synthetic polymers: Chemical physical, environmental, and technological considerations. *J Polym Sci Macromol Rev* 1979;14:419–58.
- [167] Pinho PG, Pio C a., Carter WPL, Jenkin ME. Evaluation of alkene degradation in the detailed tropospheric chemistry mechanism, MCM v3, using environmental chamber data. *J Atmos Chem* 2006;55:55–79.
- [168] Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Biomedical applications of biodegradable polymers. *J Polym Sci Part B Polym Phys* 2011;49:832–64.

- [169] Von Burkersroda F, Schedl L, Göpferich A. Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials* 2002;23:4221–31.
- [170] Chien-Chi Lin KSA. Chapter II.4.3 - The Biodegradation of Biodegradable Polymeric Biomaterials. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE (eds). *Biomater. Sci.*, Academic Press; 2013, p. 716–28.
- [171] Tsuji H. 21. Hydrolytic degradation. *Poly (lactic acid) Synth. Struct. Prop. Process. Appl.*, vol. 10, Wiley. com; 2011.
- [172] Liu L, Li S, Garreau H, Vert M. Selective enzymatic degradations of poly(L-lactide) and poly(epsilon-caprolactone) blend films. *Biomacromolecules* 2000;1:350–9.
- [173] Li S. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. *J Biomed Mater Res* 1999;48:342–53.
- [174] Lu L, Peter SJ, Lyman MD, Lai HL, Leite SM, Tamada J a, et al. In vitro degradation of porous poly(L-lactic acid) foams. *Biomaterials* 2000;21:1595–605.
- [175] Göpferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 1996;17:103–14.
- [176] Drumright RE, Gruber PR, Henton DE. Polylactic Acid Technology. *Adv Mater* 2000;12:1841–6.
- [177] Lunt J. Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. *Polym Degrad Stab* 1998;59:145–52.
- [178] Groot W, Van Krieken J, Sliemers O, De Vos S. Production and Purification of Lactic Acid and Lactide. *Poly (lactic Acid) Synth Struct Prop Process Appl* 2011;10:1.

- [179] Lasprilla AJR, Martinez G a R, Lunelli BH, Jardini AL, Filho RM. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - a review. *Biotechnol Adv* 2012;30:321–8.
- [180] Ruan G, Feng S-S. Preparation and characterization of poly(lactic acid)–poly(ethylene glycol)–poly(lactic acid) (PLA–PEG–PLA) microspheres for controlled release of paclitaxel. *Biomaterials* 2003;24:5037–44.
- [181] Tsuji H. Polylactides. *Biopolym. Online*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2005.
- [182] Saha SK, Tsuji H. Effects of molecular weight and small amounts of d-lactide units on hydrolytic degradation of poly(l-lactic acid)s. *Polym Degrad Stab* 2006;91:1665–73.
- [183] Alexis F, Venkatraman S, Kumar Rath S, Gan L-H. Some insight into hydrolytic scission mechanisms in bioerodible polyesters. *J Appl Polym Sci* 2006;102:3111–7.
- [184] Zhang T, Hu J, Duan Y, Pi F, Zhang J. Physical aging enhanced mesomorphic structure in melt-quenched poly(L-lactic acid). *J Phys Chem B* 2011;115:13835–41.
- [185] Zhang X, Wyss UP, Pichora D, Goosen MF a. An Investigation of Poly(lactic acid) Degradation. *J Bioact Compat Polym* 1994;9:80–100.
- [186] Tsuji H, Mizuno A, Ikada Y. Properties and Morphology of Poly (L-lactide). III . Effects of Initial Crystallinity on Long-Term In Vitro Hydrolysis of High Molecular Weight Poly (L-lactide) Film in Phosphate-Buffered Solution. *J Appl Polym Sci* 2000;77:1452–64.
- [187] Joziassse CAP, Grijpma DW, Bergsma JE, Cordewener FW, Bos RRM, Pennings AJ. The influence of morphology on the hydrolytic degradation of as-polymerized and hot-drawn poly(L-lactide). *Colloid Polym Sci* 1998;276:968–75.

- [188] Sarasua JR, López-Rodríguez N, Zuza E, Petisco S, Castro B, del Olmo M, et al. Crystallinity assessment and in vitro cytotoxicity of polylactide scaffolds for biomedical applications. *J Mater Sci Mater Med* 2011;22:2513–23.
- [189] Tsuji H, Ikarashi K. In vitro hydrolysis of poly(L-lactide) crystalline residues as extended-chain crystallites. Part I: long-term hydrolysis in phosphate-buffered solution at 37 degrees C. *Biomaterials* 2004;25:5449–55.
- [190] Karst D, Yang Y. Molecular modeling study of the resistance of PLA to hydrolysis based on the blending of PLLA and PDLA. *Polymer (Guildf)* 2006;47:4845–50.
- [191] Karst D, Yang Y. Effect of Arrangement of L-Lactide and D-Lactide in Poly[(L-lactide)-co-(D-lactide)] on its Resistance to Hydrolysis Studied by Molecular Modeling. *Macromol Chem Phys* 2008;209:168–74.
- [192] Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008;29:2941–53.
- [193] Tai NR, Salacinski HJ, Edwards A, Hamilton G, Seifalian AM. Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction. *Br J Surg* 2000;87:1516–24.
- [194] Vantricht I, Dewachter D, Tordoir J, Verdonck P. Hemodynamics in a compliant hydraulic model of straight tapered PTFE arteriovenous graft. *J Surg Res* 2004;116:297–304.
- [195] Dieval F, Chakfe N, Wang L, Riepe G, Thaveau F, Heintz C, et al. Mechanisms of Rupture of Knitted Polyester Vascular Prostheses: An In vitro Analysis of Virgin Prostheses. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003;26:429–36.
- [196] Wong CS, Sgarioto M, Owida A a, Yang W, Rosenfeldt FL, Morsi YS. Polyethyleneterephthalate provides superior retention of endothelial cells during

- shear stress compared to polytetrafluoroethylene and pericardium. *Heart Lung Circ* 2006;15:371–7.
- [197] Garlotta D. A Literature Review of Poly(Lactic Acid). *J Polym Environ* 2001;9:63–84.
- [198] Gupta B, Revagade N, Hilborn J. Poly(lactic acid) fiber: An overview. *Prog Polym Sci* 2007;32:455–82.
- [199] Cottin-Bizonne S, Chakfé N, Beaufigeaz M, Le Magnen JF, Dieval F, Durand B. Les polymères synthétiques résorbables et applications pour les prothèses artérielles. *Cardiovasculaire* 1999;21:62–75.
- [200] Kricheldorf HR. Syntheses and application of polylactides. *Chemosphere* 2001;43:49–54.
- [201] Tsuji H. Poly(lactide) Stereocomplexes: Formation, Structure, Properties, Degradation, and Applications. *Macromol Biosci* 2005;5:569–97.
- [202] Bastioli C. Handbook of biodegradable polymers. iSmithers Rapra Publishing; 2005.
- [203] Viljanmaa M, Södergard A, R. Mattila, Törmälä P. Hydrolytic and environmental degradation of lactic acid based hot melt adhesives. *Polym Degrad Stab* 2002;78:269–78.
- [204] Chen VJ, Ma PX. The effect of surface area on the degradation rate of nano-fibrous poly(L-lactic acid) foams. *Biomaterials* 2006;27:3708–15.
- [205] Tsuji H, Tsuruno T. Accelerated hydrolytic degradation of Poly(l-lactide)/Poly(d-lactide) stereocomplex up to late stage. *Polym Degrad Stab* 2010;95:477–84.

- [206] Yuan X, Mak AFT, Yao K. Comparative observation of accelerated degradation of poly (L-lactic acid) fibres in phosphate buffered saline and a dilute alkaline solution. *Polym Degrad Stab* 2002;75:45–53.
- [207] Andersson SR, Hakkarainen M, Inkinen S, Södergård A, Albertsson A-C. Polylactide stereocomplexation leads to higher hydrolytic stability but more acidic hydrolysis product pattern. *Biomacromolecules* 2010;11:1067–73.
- [208] Chen C-C, Chueh J-Y, Tseng H, Huang H-M, Lee S-Y. Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends. *Biomaterials* 2003;24:1167–73.
- [209] Duek EAR, Zavaglia CAC, Belangero WD. In vitro study of poly (lactic acid) pin degradation. *Polymer (Guildf)* 1999;40:6465–73.
- [210] Cui W, Zhu X, Yang Y, Li X, Jin Y. Evaluation of electrospun fibrous scaffolds of poly(dl-lactide) and poly(ethylene glycol) for skin tissue engineering. *Mater Sci Eng C* 2009;29:1869–76.
- [211] Chisholm MH, Iyer SS, McCollum DG, Pagel M, Werner-Zwanziger U. Microstructure of Poly(lactide). Phase-Sensitive HETCOR Spectra of Poly(meso - lactide), Poly(r ac -lactide), and Atactic Poly(lactide). *Macromolecules* 1999;32:963–73.
- [212] Espartero JL, Rashkov I, Li SM, Manolova N, Vert M. NMR Analysis of Low Molecular Weight Poly(lactic acid)s. *Macromolecules* 1996;29:3535–9.
- [213] Thakur K a. M, Kean RT, Hall ES, Kolstad JJ, Lindgren T a., Doscotch M a., et al. High-Resolution ^{13}C and ^1H Solution NMR Study of Poly(lactide). *Macromolecules* 1997;30:2422–8.

- [214] Zell MT, Padden BE, Paterick AJ, Thakur KAM, Kean RT, Hillmyer MA, et al. Unambiguous Determination of the ^{13}C and ^1H NMR Stereosequence Assignments of Polylactide Using High-Resolution Solution NMR Spectroscopy. *Macromolecules* 2002;35:7700–7.
- [215] Coudane J, Ustariz-Peyret C, Schwach G, Vert M. More about the stereodependence of DD and LL pair linkages during the ring-opening polymerization of racemic lactide. *J Polym Sci Part A Polym Chem* 1997;35:1651–8.
- [216] Kasperczyk JE. HETCOR NMR study of poly (rac -lactide) and poly (meso -lactide). *Polymer (Guildf)* 1999;40:5455–8.
- [217] Thakur KAM, Kean RT, Hall ES, Doscotch MA, Munson EJ. A Quantitative Method for Determination of Lactide Composition in Poly(lactide) Using ^1H NMR. *Anal Chem* 1997;69:4303–9.
- [218] Bero M, Jedlinski Z, Kasperczyk J. Coordination polymerisation of lactide, 1 Structure determination of obtained polymers. *Makromolecular Chemie* 1990;191:2287–96.
- [219] Kricheldorf, Boettcher, Tonnes. Polylactone 23 : polymerization of racemic and meso DL lactide with various organotin catalysts - stereochemical aspects.pdf. *Polymer (Guildf)* 1991;33:2817–24.
- [220] Sambha'a L, Lallam A, Jada A. Effect of Hydrothermal Polylactic Acid Degradation on Polymer Molecular Weight and Surface Properties. *J Polym Environ* 2010;18:532–8.
- [221] Ovitt TM, Coates GW. Stereochemistry of lactide polymerization with chiral catalysts: new opportunities for stereocontrol using polymer exchange mechanisms. *J Am Chem Soc* 2002;124:1316–26.

- [222] Gonçalves CMB, Coutinho JAP, Marrucho IM. Optical Properties. Poly(lactic acid) Synth. Struct. Prop. Process. Appl., John Wiley & Sons, Inc.; 2010, p. 97–112.
- [223] Tsuji H. Hydrolytic degradation. In: Auras R, Lim L-T, Selke SEM, Tsuji H, editors. Poly(lactic acid) Synth. Struct. Prop. Process. Appl. (Chapter 21), Hoboken: John Wiley and Sons, Inc.; 2010, p. 345–82.
- [224] Zong X, Ran S, Kim K-S, Fang D, Hsiao BS, Chu B. Structure and morphology changes during in vitro degradation of electrospun poly(glycolide-co-lactide) nanofiber membrane. *Biomacromolecules* 2003;4:416–23.
- [225] Tan HY, Widjaja E, Boey F, Loo SCJ. Spectroscopy techniques for analyzing the hydrolysis of PLGA and PLLA. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;91:433–40.
- [226] Renouf-Glauser AC, Rose J, Farrar D, Cameron RE. A degradation study of PLLA containing lauric acid. *Biomaterials* 2005;26:2415–22.
- [227] Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, et al. Practice Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease (Lower Extremity, Renal, Mesenteric, and Abdominal Aortic). *Circulation* 2006;113:410–528.
- [228] Rooke TW, Hirsch AT, Misra S, Sidawy AN, Beckman JA, Findeiss LK, et al. Focused Update of the Guideline for the Management of Patients With Peripheral Artery Disease (Updating the 2005 Guideline). *Circulation* 2012;125:501–31.
- [229] Cleary MA, Geiger E, Grady C, Best C, Naito Y, Breuer C. Vascular tissue engineering: the next generation. *Trends Mol Med* 2012;18:395–405.
- [230] Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;64:72–82.

- [231] Ige OO, Umoru LE, Aribio S. Natural Products : A Minefield of Biomaterials. *Mater Sci* 2012;2012:1–20.
- [232] Fraunhofer JA Von, Sichinat WJ. Characterization of surgical suture materials using dynamic mechanical analysis. *Biomaterials* 1992;13:715–20.
- [233] Nishio S, Kosuga K, Igaki K, Okada M, Kyo E, Tsuji T, et al. Long-Term (>10 Years) clinical outcomes of first-in-human biodegradable poly-L-lactic acid coronary stents: Igaki-Tamai stents. *Circulation* 2012;125:2343–53.
- [234] Uurto I, Mikkonen J, Parkkinen J, Keski-nisula L, Nevalainen T, Kelloma M. Drug-Eluting Biodegradable Poly-D/L-Lactic Acid Vascular Stents: An Experimental Pilot Study. *J Endovasc Ther* 2005;12:371–9.
- [235] Deng C, Jiang Y, Cheng R, Meng F, Zhong Z. Biodegradable polymeric micelles for targeted and controlled anticancer drug delivery: Promises, progress and prospects. *Nano Today* 2012;7:467–80.
- [236] Auras R, Lim L-T, Selke SEM, Tsuji H. Poly(lactic acid) : Synthesis, structures, properties, processing and application. 2010.
- [237] Sabbatier G, Le Nouën D, Chevallier P, Durand B, Laroche G, Dieval F. Air spun poly(lactic acid) nanofiber scaffold degradation for vascular tissue engineering: A ¹H NMR study. *Polym Degrad Stab* 2012;97:1520–6.
- [238] Bognitzki M, Czado W, Frese T, Schaper A, Hellwig M, Steinhart M, et al. Nanostructured Fibers via Electrospinning. *Adv Mater* 2001;13:70–2.
- [239] Ko F, Gogotsi Y, Ali A, Naguib N, Ye H, Yang G, et al. Electrospinning of Continuous Carbon. *Adv Mater* 2003;15:1161–5.
- [240] Sun Z, Zussman E, Yarin AL, Wendorff JH, Greiner A. Compound Core-Shell Polymer Nanofibers by co-electrospinning. *Adv Mater* 2003;15:1929–32.

- [241] Hou H, Reneker DH. Carbon Nanotubes on Carbon Nanofibers: A Novel Structure Based on Electrospun Polymer Nanofibers. *Adv Mater* 2004;16:69–73.
- [242] Orlova Y, Magome N, Liu L, Chen Y, Agladze K. Electrospun nanofibers as a tool for architecture control in engineered cardiac tissue. *Biomaterials* 2011;32:5615–24.
- [243] Beachley V, Wen X. Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. *Prog Polym Sci* 2010;35:868–92.
- [244] Naveena N, Venugopal J, Rajeswari R, Sundarrajan S, Sridhar R, Shayanti M, et al. Biomimetic composites and stem cells interaction for bone and cartilage tissue regeneration. *J Mater Chem* 2012;22:5239–53.
- [245] 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.
- [246] Chandrasekaran AR, Venugopal J, Sundarrajan S, Ramakrishna S. Fabrication of a nanofibrous scaffold with improved bioactivity for culture of human dermal fibroblasts for skin regeneration. *Biomed Mater* 2011;6:15001.
- [247] Ravichandran R, Venugopal JR, Sundarrajan S, Mukherjee S, Ramakrishna S. Poly(Glycerol Sebacate)/ Gelatin Core/Shell Fibrous Structure for Regeneration on Myocardial Infarction. *Tissue Eng* 2011;17:1363–73.
- [248] Yin Z, Chen X, Chen JL, Shen WL, Hieu Nguyen TM, Gao L, et al. The regulation of tendon stem cell differentiation by the alignment of nanofibers. *Biomaterials* 2010;31:2163–75.
- [249] Schnell E, Klinkhammer K, Balzer S, Brook G, Klee D, Dalton P, et al. Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly- ϵ -

- caprolactone and a collagen/poly- ϵ -caprolactone blend. *Biomaterials* 2007;28:3012–25.
- [250] Woo KM, Chen VJ, Ma PX. Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. *J Biomed Mater Res Part A* 2003;67A:531–7.
- [251] Kim TG, Park TG. Biomimicking extracellular matrix: cell adhesive RGD peptide modified electrospun poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) nanofiber mesh. *Tissue Eng* 2006;12:221–33.
- [252] Oliveira JE, Moraes EA, Costa RGF, Afonso AS, Mattoso LHC, Orts WJ, et al. Nano and submicrometric fibers of poly(D,L-lactide) obtained by solution blow spinning: Process and solution variables. *J Appl Polym Sci* 2011;122:3396–405.
- [253] Box GEP, Hunter JS, Hunter WG. *Statistics for Experimenters Design, Innovation and Discovery*. 2nd editio. Wiley Interscience; 2005.
- [254] Ellison CJ, Phatak A, Giles DW, Macosko CW, Bates FS. Melt blown nanofibers: Fiber diameter distributions and onset of fiber breakup. *Polymer (Guildf)* 2007;48:3306–16.
- [255] Yördem OS, Papila M, Menceloğlu YZ. Effects of electrospinning parameters on polyacrylonitrile nanofiber diameter: An investigation by response surface methodology. *Mater Des* 2008;29:34–44.
- [256] Colby RH, Rubinstein M. Two-parameter scaling for polymers in Θ solvents. *Macromolecules* 1990;23:2753–7.
- [257] Kasaii MR, Charlet G, Arul J. Master curve for concentration dependence of semi-dilute solution viscosity of chitosan homologues: the Martin equation. *Food Res Int* 2000;33:63–7.

- [258] Neo YP, Ray S, Easteal AJ, Nikolaidis MG, Quek SY. Influence of solution and processing parameters towards the fabrication of electrospun zein fibers with sub-micron diameter. *J Food Eng* 2012;109:645–51.
- [259] De Gennes PG. Dynamics of Entangled Polymer Solutions. II. Inclusion of Hydrodynamic Interactions. *Macromolecules* 1976;9:594–8.
- [260] Shih Y-H, Yang J-C, Li S-H, Yang W-CV, Chen C-C. Bio-electrospinning of poly(l-lactic acid) hollow fibrous membrane. *Text Res J* 2012;82 :602–12.
- [261] Tsuji H, Nakano M, Hashimoto M, Takashima K, Katsura S, Mizuno A. Electrospinning of Poly(lactic acid) Stereocomplex Nanofibers. *Biomacromolecules* 2006;7:3316–20.
- [262] Inai R, Kotaki M, Ramakrishna S. Deformation behavior of electrospun poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) nonwoven membranes under uniaxial tensile loading. *J Polym Sci Part B Polym Phys* 2005;43:3205–12.
- [263] Nitanan T, Opanasopit P, Akkaramongkolporn P, Rojanarata T, Ngawhirunpat T, Supaphol P. Effects of processing parameters on morphology of electrospun polystyrene nanofibers. *Korean J Chem Eng* 2012;29:173–81.
- [264] Deitzel JM, Kleinmeyer J, Harris D, Beck Tan NC. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer (Guildf)* 2001;42:261–72.
- [265] Mo XM, Xu CY, Kotaki M, Ramakrishna S. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. *Biomaterials* 2004;25:1883–90.

- [266] Barnes CP, Sell SA, Boland ED, Simpson DG, Bowlin GL. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:1413–33.
- [267] Kong CS, Lee SG, Lee SH, Lee KH, Noh HW, Yoo WS, et al. Electrospinning Instabilities in the Drop Formation and Multi-Jet Ejection Part II: Various Nozzle Diameters for PVA (Polyvinyl Alcohol) Polymer Solution. *J Macromol Sci Part B* 2011;50:528–39.
- [268] Larrondo L, Manley RSJ. Electrostatic fiber spinning from polymer melts. III. Electrostatic deformation of a pendant drop of polymer melt. *J Polym Sci* 1981;19:933–40.
- [269] Casper CL, Stephens JS, Tassi NG, Chase DB, Rabolt JF. Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers: Effect of Humidity and Molecular Weight in the Electrospinning Process. *Macromolecules* 2003;37:573–8.
- [270] Gupta P, Elkins C, Long TE, Wilkes GL. Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent. *Polymer (Guildf)* 2005;46:4799–810.
- [271] Kong L, Ziegler GR. Role of Molecular Entanglements in Starch Fiber Formation by Electrospinning. *Biomacromolecules* 2012;13:2247–53.
- [272] Shenoy SL, Bates WD, Frisch HL, Wnek GE. Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: good solvent, non-specific polymer-polymer interaction limit. *Polymer (Guildf)* 2005;46:3372.
- [273] Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. AHA Statistical Update. *Circulation* 2013;127:e6–245.

- [274] Zhang X, Reagan MR, Kaplan DL. Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61:988–1006.
- [275] Ramakrishna S, Jose R, Archana PS, Nair AS, Balamurugan R, Venugopal J, et al. Science and engineering of electrospun nanofibers for advances in clean energy, water filtration, and regenerative medicine. *J Mater Sci* 2010;45:6283–312.
- [276] Liu W, Thomopoulos S, Xia Y. Electrospun nanofibers for regenerative medicine. *Adv Healthc Mater* 2012;1:10–25.
- [277] Koombhongse S, Liu W, Reneker DH. Flat polymer ribbons and other shapes by electrospinning. *J Polym Sci Part B Polym Phys* 2001;39:2598–606.
- [278] Sun Z, Zussman E, Yarin AL, Wendorff JH, Greiner A. Compound Core–Shell Polymer Nanofibers by Co-Electrospinning. *Adv Mater* 2003;15:1929–32.
- [279] Li D, Xia Y. Direct Fabrication of Composite and Ceramic Hollow Nanofibers by Electrospinning. *Nano Lett* 2004;4:933–8.
- [280] Brown TD, Dalton PD, Hutmacher DW. Direct Writing By Way of Melt Electrospinning. *Adv Mater* 2011;23:5651–7.
- [281] Yoshimoto H, Shin YM, Terai H, Vacanti JP. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2003;24:2077–82.
- [282] Kumbar SG, Nukavarapu SP, James R, Nair LS, Laurencin CT. Electrospun poly (lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials* 2008;29:4100–7.
- [283] Zong X, Bien H, Chung C-Y, Yin L, Fang D, Hsiao BS, et al. Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs. *Biomaterials* 2005;26:5330–8.

- [284] 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.
- [285] Shin M, Yoshimoto H, Vacanti JP. In vivo bone tissue engineering using mesenchymal stem cells on a novel electrospun nanofibrous scaffold. *Tissue Eng* 2004;10:33–41.
- [286] Xie J, Willerth SM, Li X, Macewan MR, Rader A, Sakiyama-Elbert SE, et al. The differentiation of embryonic stem cells seeded on electrospun nanofibers into neural lineages. *Biomaterials* 2009;30:354–62.
- [287] Sabbatier G, Abadie P, Dieval F, Durand B, Laroche G. Evaluation of an air spinning process to produce tailored biosynthetic nanofibre scaffolds. *Mater Sci Eng C* 2014;35:347–53.
- [288] Treiser M, Abramson S, Langer R, Kohn J. Chapter I.2.6 - Degradable and Resorbable Biomaterials. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JEBT-BS (Third E, editors. *Biomater. Sci. (Third Ed. An Introd. to Mater. Med., Academic Press; 2013, p. 179–95.*
- [289] Frazza EJ, Schmitt EE. A new absorbable suture. *J Biomed Mater Res* 1971;5:43–58.
- [290] Ko NR, Sabbatier G, Cunningham A, Laroche G, Oh JK. Air-Spun PLA Nanofibers Modified with Reductively Sheddable Hydrophilic Surfaces for Vascular Tissue Engineering: Synthesis and Surface Modification. *Macromol Rapid Commun* 2014;35:447–53.
- [291] Iqbal J, Gunn J, Serruys PW. Coronary stents: historical development, current status and future directions. *Br Med Bull* 2013;106 :193–211.

- [292] Fernández J, Larrañaga A, Etxeberria A, Sarasua JR. Effects of chain microstructures and derived crystallization capability on hydrolytic degradation of poly(l-lactide/ ϵ -caprolactone) copolymers. *Polym Degrad Stab* 2013;98:481–9.
- [293] Cordewener FW, van Geffen MF, Joziassse C a, Schmitz JP, Bos RR, Rozema FR, et al. Cytotoxicity of poly(96L/4D-lactide): the influence of degradation and sterilization. *Biomaterials* 2000;21:2433–42.
- [294] Fernández J, Larrañaga A, Etxeberria A, Wang W, Sarasua JR. A new generation of poly(lactide/ ϵ -caprolactone) polymeric biomaterials for application in the medical field. *J Biomed Mater Res Part A* 2013;102:1–12.
- [295] Fernández J, Larrañaga A, Sarasua J-R. Novel random terpolymers based on d-lactide, l-lactide and ϵ -caprolactone. WO 2014135727 A1, 2014.
- [296] Fernández J, Meaurio E, Chaos A, Etxeberria A, Alonso-Varona A, Sarasua JR. Synthesis and characterization of poly(L-lactide/ ϵ -caprolactone) statistical copolymers with well resolved chain microstructures. *Polymer (Guildf)* 2013;54:2621–31.
- [297] Weir N, Buchanan FJ, Orr JF, Farrar DF, Dickson GR. Degradation of poly-L-lactide. Part 2: increased temperature accelerated degradation. *Proc Inst Mech Eng Part H J Eng Med* 2004;218:321–30.
- [298] Fernández J, Etxeberria A, Sarasua J-R. Synthesis, structure and properties of poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) statistical copolymers. *J Mech Behav Biomed Mater* 2012;9:100–12.
- [299] Sarasua J-R, Prud'homme RE, Wisniewski M, Le Borgne A, Spassky N. Crystallization and Melting Behavior of Polylactides. *Macromolecules* 1998;31:3895–905.

- [300] Gosline J, Lillie M, Carrington E, Guerette P, Ortlepp C, Savage K. Elastic proteins: biological roles and mechanical properties. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2002;357:121–32.
- [301] Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 1996;17:93–102.
- [302] Serrano MC, Pagani R, Vallet-Regí M, Peña J, Rámila a, Izquierdo I, et al. In vitro biocompatibility assessment of poly(epsilon-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. *Biomaterials* 2004;25:5603–11.
- [303] 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.
- [304] Chen M, Patra PK, Warner SB, Bhowmick S. Role of fiber diameter in adhesion and proliferation of NIH 3T3 fibroblast on electrospun polycaprolactone scaffolds. *Tissue Eng* 2007;13:579–87.
- [305] Tian H, Tang Z, Zhuang X, Chen X, Jing X. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Prog Polym Sci* 2012;37:237–80.
- [306] Middleton JC, Tipton a J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 2000;21:2335–46.
- [307] Taylor MS, Daniels AU, Andriano KP, Heller J. Six bioabsorbable polymers: in vitro acute toxicity of accumulated degradation products. *J Appl Biomater* 1994;5:151–7.

- [308] Yoon SJ, Kim SH, Ha HJ, Ko YK, So JW, Kim MS, et al. Reduction of inflammatory reaction of poly(d,l-lactic-co-glycolic Acid) using demineralized bone particles. *Tissue Eng Part A* 2008;14:539–47.
- [309] Rocco KA, Maxfield MW, Best C, Dean EW, Breuer CK. In Vivo Applications of Electrospun Tissue-Engineered Vascular Grafts: A Review. *Tissue Eng* 2014;20:628–40.
- [310] Choi J, Cho SB, Lee BS, Joung YK, Park K, Han DK. Improvement of interfacial adhesion of biodegradable polymers coated on metal surface by nanocoupling. *Langmuir* 2011;27:14232–9.
- [311] Fu K, Pack DW, Klibanov a M, Langer R. Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. *Pharm Res* 2000;17:100–6.
- [312] Petisco S, Larrañaga A, Gracia C, Sarasua J. Evaluation of shape memory of a poly (racDL-lactide-co-glycolide) amorphous copolymer. *Eurotech*, 2013, p. 488–93.
- [313] Picciochi R, Wang Y, Alves N, Mano J. Glass transition of semi-crystalline PLLA with different morphologies as studied by dynamic mechanical analysis. *Colloid Polym Sci* 2007;285:575–80.
- [314] Dong Y, Liao S, Ngiam M, Chan CK, Ramakrishna S. Degradation behaviors of electrospun resorbable polyester nanofibers. *Tissue Eng Part B Rev* 2009;15:333–51.
- [315] Gleadall A, Pan J, Kruft M-A, Kellomäki M. Degradation mechanisms of bioresorbable polyesters. Part 1. Effects of random scission, end scission and autocatalysis. *Acta Biomater* 2014;10:2223–32.
- [316] Varabhas JS, Chase GG, Reneker DH. Electrospun nanofibers from a porous hollow tube. *Polymer (Guildf)* 2008;49:4226–9.

- [317] Dong Y, Yong T, Liao S, Chan CK, Stevens MM, Ramakrishna S. Distinctive degradation behaviors of electrospun polyglycolide, poly (dl-lactide-co-glycolide), and poly (l-lactide-co- ϵ -caprolactone) nanofibers cultured with/without porcine smooth muscle cells. *Tissue Eng Part A* 2009;16:283–98.
- [318] Van Sliedregt A, Radder AM, de Groot K, van Blitterswijk CA. In vitro biocompatibility testing of polylactides Part I Proliferation of different cell types. *J Mater Sci Mater Med* 1992;3:365–70.
- [319] Böstman O, Pihlajamäki H. Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review. *Biomaterials* 2000;21:2615–21.
- [320] Sgouras D, Duncan R. Methods for the evaluation of biocompatibility of soluble synthetic polymers which have potential for biomedical use: 1 — Use of the tetrazolium-based colorimetric assay (MTT) as a preliminary screen for evaluation of in vitro cytotoxicity. *J Mater Sci Mater Med* 1990;1:61–8.
- [321] Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue Eng* 2006;12:1197–211.
- [322] Chen M, Patra prabir k, Warner steven b, Bhowmick S. Optimization of electrospinning process parameters for tissue engineering scaffolds. *Biophys Rev Lett* 2006;1:153–78.
- [323] Teo WE, Ramakrishna S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology* 2006;17:R89.
- [324] Medeiros ES, Glenn GM, Klamczynski AP, Orts WJ, Mattoso LHC. Solution blow spinning: A new method to produce micro- and nanofibers from polymer solutions. *J Appl Polym Sci* 2009;113:2322–30.

- [325] Wang J-Z, Huang X-B, Xiao J, Li N, Yu W-T, Wang W, et al. Spray-spinning: a novel method for making alginate/chitosan fibrous scaffold. *J Mater Sci Mater Med* 2010;21:497–506.
- [326] Abdal-hay A, Sheikh F a, Lim JK. Air jet spinning of hydroxyapatite/poly(lactic acid) hybrid nanocomposite membrane mats for bone tissue engineering. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013;102:635–43.
- [327] Tutak W, Sarkar S, Lin-Gibson S, Farooque TM, Jyotsnendu G, Wang D, et al. The support of bone marrow stromal cell differentiation by airbrushed nanofiber scaffolds. *Biomaterials* 2013;34:2389–98.
- [328] Fiedler H, Nottmeyer K, Wegener PP, Raghu S. Schlieren photography of water flow. *Exp Fluids* 1985;3:145–51.
- [329] Regert T, Grossir G, Paris S, Blay Esteban L. Schlieren visualization for high-speed flows based on laser-induced fluorescence. *Exp Fluids* 2014;55:1–6.
- [330] De Luca M. Contribution à la modélisation de la pulvérisation d'un liquide phytosanitaire en vue de réduire les pollutions. 2007.
- [331] Kim E, Kim S, Lee C. Electrospinning of polylactide fibers containing silver nanoparticles. *Macromol Res* 2010;18:215–21.
- [332] Theron SA, Yarin AL, Zussman E, Kroll E. Multiple jets in electrospinning: experiment and modeling. *Polymer (Guildf)* 2005;46:2889.
- [333] Yousefzadeh M, Latifi M, Teo W-E, Amani-Tehran M, Ramakrishna S. Producing continuous twisted yarn from well-aligned nanofibers by water vortex. *Polym Eng Sci* 2011;51:323–9.
- [334] Chung S, King MW. Design concepts and strategies for tissue engineering scaffolds. *Biotechnol Appl Biochem* 2011;58:423–38.

- [335] Khorshidi S, Solouk A, Mirzadeh H, Mazinani S, Lagaron JM, Sharifi S, et al. A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue engineering applications. *J Tissue Eng Regen Med* 2015.
- [336] Hadjizadeh A, Doillon CJ. Directional migration of endothelial cells towards angiogenesis using polymer fibres in a 3D co-culture system. *J Tissue Eng Regen Med* 2010;4:524–31.
- [337] Matyjaszewski K, Xia J. Atom Transfer Radical Polymerization. *Chem Rev* 2001;101:2921–90.
- [338] Sarra-Bournet C, Turgeon S, Mantovani D, Laroche G. A study of atmospheric pressure plasma discharges for surface functionalization of PTFE used in biomedical applications. *J Phys D Appl Phys* 2006;39:3461–9.
- [339] Hoesli CA, Garnier A, Juneau P-M, Chevallier P, Duchesne C, Laroche G. A fluorophore-tagged RGD peptide to control endothelial cell adhesion to micropatterned surfaces. *Biomaterials* 2014;35:879–90.
- [340] Conway DE, Breckenridge MT, Hinde E, Gratton E, Chen CS, Schwartz MA. Fluid Shear Stress on Endothelial Cells Modulates Mechanical Tension across VE-Cadherin and PECAM-1. *Curr Biol* 2013;23:1024–30.
- [341] Vallières K. Amélioration des qualités fonctionnelles des implants à destinée vasculaire. 2009.
- [342] Dechy-Cabaret O, Martin-Vaca B, Bourissou D. Controlled Ring-Opening Polymerization of Lactide and Glycolide. *Chem Rev* 2004;104:6147–76.
- [343] Penczek S, Cypryk M, Duda A, Kubisa P, Słomkowski S. Living ring-opening polymerizations of heterocyclic monomers. *Prog Polym Sci* 2007;32:247–82.

- [344] Oh JK. Polylactide (PLA)-based amphiphilic block copolymers: synthesis, self-assembly, and biomedical applications. *Soft Matter* 2011;7:5096–108.
- [345] Wang C, Yan K-W, Lin Y-D, Hsieh PCH. Biodegradable Core/Shell Fibers by Coaxial Electrospinning: Processing, Fiber Characterization, and Its Application in Sustained Drug Release. *Macromolecules* 2010;43:6389–97.
- [346] Torres-Giner S, Martinez-Abad A, Gimeno-Alcañiz J V, Ocio MJ, Lagaron JM. Controlled Delivery of Gentamicin Antibiotic from Bioactive Electrospun Polylactide-Based Ultrathin Fibers. *Adv Eng Mater* 2012;14:B112–22.
- [347] Zheng F, Wang S, Shen M, Zhu M, Shi X. Antitumor efficacy of doxorubicin-loaded electrospun nano-hydroxyapatite-poly(lactic-co-glycolic acid) composite nanofibers. *Polym Chem* 2013;4:933–41.
- [348] He S, Xia T, Wang H, Wei L, Luo X, Li X. Multiple release of polyplexes of plasmids VEGF and bFGF from electrospun fibrous scaffolds towards regeneration of mature blood vessels. *Acta Biomater* 2012;8:2659–69.
- [349] Zhou C, Shi Q, Guo W, Terrell L, Qureshi AT, Hayes DJ, et al. Electrospun Bio-Nanocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering by Cellulose Nanocrystals Reinforcing Maleic Anhydride Grafted PLA. *ACS Appl Mater Interfaces* 2013;5:3847–54.
- [350] Lee H, Ahn S, Choi H, Cho D, Kim G. Fabrication, characterization, and in vitro biological activities of melt-electrospun PLA micro/nanofibers for bone tissue regeneration. *J Mater Chem B* 2013;1:3670–7.
- [351] Kannan RY, Salacinski HJ, Butler PE, Hamilton G, Seifalian AM. Current status of prosthetic bypass grafts: A review. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 2005;74B:570–81.

- [352] Greenwald SE, Berry CL. Improving vascular grafts: the importance of mechanical and haemodynamic properties. *J Pathol* 2000;190:292–9.
- [353] Sefton M V, Gemmell CH, Gorbet MB. Appendix E - Chapter II.5.2 – Nonthrombogenic Treatments and Strategies. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JEBT-BS (Third E, editors. *Biomater. Sci. (Third Ed. An Introd. to Mater. Med., Academic Press; 2012, p. 1488–509.*
- [354] Lancuški A, Bossard F, Fort S. Carbohydrate-Decorated PCL Fibers for Specific Protein Adhesion. *Biomacromolecules* 2013;14:1877–84.
- [355] Kim HS, Ham HO, Son YJ, Messersmith PB, Yoo HS. Electrospun catechol-modified poly(ethyleneglycol) nanofibrous mesh for anti-fouling properties. *J Mater Chem B* 2013;1:3940–9.
- [356] Fu GD, Lei JY, Yao C, Li XS, Yao F, Nie SZ, et al. Core–Sheath Nanofibers from Combined Atom Transfer Radical Polymerization and Electrospinning. *Macromolecules* 2008;41:6854–8.
- [357] Gualandi C, Vo CD, Focarete ML, Scandola M, Pollicino A, Di Silvestro G, et al. Advantages of Surface-Initiated ATRP (SI-ATRP) for the Functionalization of Electrospun Materials. *Macromol Rapid Commun* 2013;34:51–6.
- [358] Özçam AE, Roskov KE, Genzer J, Spontak RJ. Responsive PET Nano/Microfibers via Surface-Initiated Polymerization. *ACS Appl Mater Interfaces* 2012;4:59–64.
- [359] Menkhaus TJ, Varadaraju H, Zhang L, Schneiderman S, Bjustrom S, Liu L, et al. Electrospun nanofiber membranes surface functionalized with 3-dimensional nanolayers as an innovative adsorption medium with ultra-high capacity and throughput. *Chem Commun* 2010;46:3720–2.

- [360] Zhang Q, Re Ko N, Kwon Oh J. Recent advances in stimuli-responsive degradable block copolymer micelles: synthesis and controlled drug delivery applications. *Chem Commun* 2012;48:7542–52.
- [361] Wang Y, Xu H, Zhang X. Tuning the Amphiphilicity of Building Blocks: Controlled Self-Assembly and Disassembly for Functional Supramolecular Materials. *Adv Mater* 2009;21:2849–64.
- [362] Tsarevsky N V, Matyjaszewski K. Reversible Redox Cleavage/Coupling of Polystyrene with Disulfide or Thiol Groups Prepared by Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* 2002;35:9009–14.
- [363] Boyer C, Soeriyadi AH, Roth PJ, Whittaker MR, Davis TP. Post-functionalization of ATRP polymers using both thiol/ene and thiol/disulfide exchange chemistry. *Chem Commun* 2011;47:1318–20.
- [364] Wei H, Zhuo R-X, Zhang X-Z. Design and development of polymeric micelles with cleavable links for intracellular drug delivery. *Prog Polym Sci* 2013;38:503–35.
- [365] Dong W-F, Kishimura A, Anraku Y, Chuanoi S, Kataoka K. Monodispersed Polymeric Nanocapsules: Spontaneous Evolution and Morphology Transition from Reducible Hetero-PEG PICmicelles by Controlled Degradation. *J Am Chem Soc* 2009;131:3804–5.
- [366] Phillips DJ, Gibson MI. Degradable thermoresponsive polymers which display redox-responsive LCST Behaviour. *Chem Commun* 2012;48:1054–6.
- [367] Rahimian-Bajgiran K, Chan N, Zhang Q, Noh SM, Lee H, Oh JK. Tuning LCST with thiol-responsiveness of thermoresponsive copolymers containing pendant disulfides. *Chem Commun* 2013;49:807–9.

- [368] Cheng R, Feng F, Meng F, Deng C, Feijen J, Zhong Z. Glutathione-responsive nano-vehicles as a promising platform for targeted intracellular drug and gene delivery. *J Control Release* 2011;152:2–12.
- [369] Meng F, Hennink WE, Zhong Z. Reduction-sensitive polymers and bioconjugates for biomedical applications. *Biomaterials* 2009;30:2180–98.
- [370] Li W, Yoon JA, Matyjaszewski K. Dual-Reactive Surfactant Used for Synthesis of Functional Nanocapsules in Miniemulsion. *J Am Chem Soc* 2010;132:7823–5.
- [371] Miyata K, Kakizawa Y, Nishiyama N, Harada A, Yamasaki Y, Koyama H, et al. Block Cationic Polyplexes with Regulated Densities of Charge and Disulfide Cross-Linking Directed To Enhance Gene Expression. *J Am Chem Soc* 2004;126:2355–61.
- [372] Petros RA, Ropp PA, DeSimone JM. Reductively Labile PRINT Particles for the Delivery of Doxorubicin to HeLa Cells. *J Am Chem Soc* 2008;130:5008–9.
- [373] Lv W, Liu S, Feng W, Qi J, Zhang G, Zhang F, et al. Temperature- and Redox-Directed Multiple Self Assembly of Poly(N-Isopropylacrylamide) Grafted Dextran Nanogels. *Macromol Rapid Commun* 2011;32:1101–7.
- [374] Aliyar HA, Hamilton PD, Ravi N. Refilling of Ocular Lens Capsule with Copolymeric Hydrogel Containing Reversible Disulfide. *Biomacromolecules* 2004;6:204–11.
- [375] Yoon JA, Bencherif SA, Aksak B, Kim EK, Kowalewski T, Oh JK, et al. Thermoresponsive Hydrogel Scaffolds with Tailored Hydrophilic Pores. *Chem – An Asian J* 2011;6:128–36.
- [376] Bontempo D, Heredia KL, Fish BA, Maynard HD. Cysteine-Reactive Polymers Synthesized by Atom Transfer Radical Polymerization for Conjugation to Proteins. *J Am Chem Soc* 2004;126:15372–3.

- [377] Boyer C, Bulmus V, Liu J, Davis TP, Stenzel MH, Barner-Kowollik C. Well-Defined Protein–Polymer Conjugates via in Situ RAFT Polymerization. *J Am Chem Soc* 2007;129:7145–54.
- [378] Boyer C, Liu J, Wong L, Tippet M, Bulmus V, Davis TP. Stability and utility of pyridyl disulfide functionality in RAFT and conventional radical polymerizations. *J Polym Sci Part A Polym Chem* 2008;46:7207–24.
- [379] Brannon-Peppas L, Keys K, Torres-Lugo M, Lowman A. Poly(ethylene glycol): Chemistry and Biological Applications. *J Control Release* 2000;66:321.
- [380] Knop K, Hoogenboom R, Fischer D, Schubert US. Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angew Chemie Int Ed* 2010;49:6288–308.
- [381] Khorsand Sourkahi B, Cunningham A, Zhang Q, Oh JK. Biodegradable Block Copolymer Micelles with Thiol-Responsive Sheddable Coronas. *Biomacromolecules* 2011;12:3819–25.
- [382] Ko NR, Yao K, Tang C, Oh JK. Synthesis and thiol-responsive degradation of polylactide-based block copolymers having disulfide junctions using ATRP and ROP. *J Polym Sci Part A Polym Chem* 2013;51:3071–80.
- [383] Sun H, Guo B, Cheng R, Meng F, Liu H, Zhong Z. Biodegradable micelles with sheddable poly(ethylene glycol) shells for triggered intracellular release of doxorubicin. *Biomaterials* 2009;30:6358–66.
- [384] Xu H, Li H, Chang J. Controlled drug release from a polymer matrix by patterned electrospun nanofibers with controllable hydrophobicity. *J Mater Chem B* 2013;1:4182–8.

- [385] Britovsek GJP, England J, White AJP. Non-heme Iron(II) Complexes Containing Tripodal Tetradentate Nitrogen Ligands and Their Application in Alkane Oxidation Catalysis. *Inorg Chem* 2005;44:8125–34.
- [386] Sarasua JR, Arraiza AL, Balerdi P, Maiza I. Crystallization and thermal behaviour of optically pure polylactides and their blends. *J Mater Sci* 2005;40:1855–62.
- [387] Tsuji H, Hyon SH, Ikada Y. Stereocomplex formation between enantiomeric poly (lactic acid) s. 4. Differential scanning calorimetric studies on precipitates from mixed solutions of poly (D-lactic acid) and poly (L-lactic acid). *Macromolecules* 1991;24:5657–62.
- [388] Mano JF, Gómez Ribelles JL, Alves NM, Salmerón Sanchez M. Glass transition dynamics and structural relaxation of PLLA studied by DSC: Influence of crystallinity. *Polymer (Guildf)* 2005;46:8258–65.
- [389] Legendre B, Grenet J. Analyse calorimétrique différentielle à balayage à température modulée (DSC-TM). *Tech L'ingénieur* 2012.
- [390] Schawe JEK, Hütter T, Heitz C, Alig I, Lellinger D. Stochastic temperature modulation: A new technique in temperature-modulated DSC. *Thermochim Acta* 2006;446:147–55.
- [391] Gracia-Fernández C a., Gómez-Barreiro S, López-Beceiro J, Naya S, Artiaga R. New approach to the double melting peak of poly(l-lactic acid) observed by DSC. *J Mater Res* 2012;27:1379–82.
- [392] Sauerbrunn S. TOPEM® - Measuring program and evaluation parameters. 2006.
- [393] Fraga I. Study of thermal transitions in polymers by a multifrequency modulated DSC technique. 2010.

- [394] Parmentier L. TOPEM , a new temperature modulated DSC technique : A critical review. 2009.
- [395] Kastinen T. Double melting behaviour and plasticization of polylactic acid - A TOPEM and FTIR study. 2012.
- [396] Fischer EW, Sterzel H, Wegner G. Investigation of the structure of solution grown crystals of lactide copolymers by means of chemical reactions. *Kolloid-Zeitschrift Und Zeitschrift Für Polym* 1973;251:980–90.
- [397] Fambri L, Migliaresi C. Crystallization and Thermal Properties. *Poly(lactic acid) Synth. Struct. Prop. Process. Appl.*, John Wiley & Sons, Inc.; 2010, p. 113–24.
- [398] Bao R, Yang W, Jiang W, Liu Z, Xie B, Yang M. Polymorphism of Racemic Poly(L-lactide)/Poly(D-lactide) Blend: Effect of Melt and Cold Crystallization. *J Phys Chem B* 2013;117:3667–74.
- [399] Shieh Y, Liu G. Temperature-Modulated Differential Scanning Calorimetry Studies on the Origin of Double Melting Peaks in Isothermally Melt-Crystallized Poly (L-lactic acid). *J Polym Sci Part B Polym Phys* 2006;45:466–74.
- [400] Yasuniwa M, Tsubakihara S, Sugimoto Y, Nakafuku C. Thermal Analysis of the Double-Melting Behavior of Poly (L -lactic acid). *J Polym Sci Part B Polym Phys* 2004;42:25–32.
- [401] Hempel E. The use of TOPEM to analyse the first run of biodegradable disposable cups. *Therm Anal User Com* 2013;32.
- [402] Pielichowska K, Król P, Król B, Pagacz J. TOPEM DSC study of glass transition region of polyurethane cationomers. *Thermochim Acta* 2012;545:187–93.

- [403] Fraga I, Hutchinson JM. TOPEM, A new temperature modulation technique : Application to the glass transition of polymers. *J Therm Anal Calorim* 2007;87:119–24.
- [404] Jiang X, Luo Y, Tian X, Huang D, Reddy N, Yang Y. Chemical Structure of Poly(Lactic Acid). *Poly(lactic acid) Synth. Struct. Prop. Process. Appl.*, John Wiley & Sons, Inc.; 2010, p. 67–82.
- [405] Zhang J, Sato H, Tsuji H, Noda I, Ozaki Y. Infrared Spectroscopic Study of CH₃---OC Interaction during Poly (l-lactide)/Poly (d-lactide) Stereocomplex Formation. *Macromolecules* 2005;38:1822–8.
- [406] Aleman C, Lotz B, Puiggali J. Crystal Structure of the alpha-Form of Poly (L-lactide). *Macromolecules* 2001;34:4795–801.
- [407] Aou K, Hsu SL. Trichroic Vibrational Analysis on the α -Form of Poly(lactic acid) Crystals Using Highly Oriented Fibers and Spherulites. *Macromolecules* 2006;39:3337–44.
- [408] Sawai D, Takahashi K, Imamura T, Nakamura K, Kanamoto T, Hyon S-H. Preparation of oriented β -form poly(L-lactic acid) by solid-state extrusion. *J Polym Sci Part B Polym Phys* 2002;40:95–104.
- [409] Cartier L, Okihara T, Ikada Y, Tsuji H, Puiggali J, Lotz B. Epitaxial crystallization and crystalline polymorphism of polylactides. *Polymer (Guildf)* 2000;41:8909–19.
- [410] Zhang J, Tashiro K, Tsuji H, Domb AJ. Disorder-to-Order Phase Transition and Multiple Melting Behavior of Poly (L-lactide) Investigated by Simultaneous Measurements of WAXD and DSC. *Macromolecules* 2008;41:1352–7.

- [411] Chen X, Han L, Zhang T, Zhang J. Influence of crystal polymorphism on crystallinity calculation of poly(l-lactic acid) by infrared spectroscopy. *Vib Spectrosc* 2014;70:1–5.
- [412] Gleadall A, Pan J, Atkinson H. A simplified theory of crystallisation induced by polymer chain scissions for biodegradable polyesters. *Polym Degrad Stab* 2012;97:1616–20.
- [413] Gonçalves CMB, Tomé LC, Coutinho JAP, Marrucho IM. Addition of α -tocopherol on poly(lactic acid): Thermal, mechanical, and sorption properties. *J Appl Polym Sci* 2011;119:2468–75.
- [414] Kister G, Cassanas G, Vert M, Pauvert B, T  rol A. Vibrational analysis of poly(L-lactic acid). *J Raman Spectrosc* 1995;26:307–11.
- [415] Kister G, Cassanas G, Vert M. Effects of morphology, conformation and configuration on the IR and Raman spectra of various poly(lactic acid)s. *Polymer (Guildf)* 1998;39:267–73.
- [416] Auras R, Harte B, Selke S. An Overview of Polylactides as Packaging Materials. *Macromol Biosci* 2004;4:835–64.
- [417] Meaurio E, Lopez-Rodriguez N, Sarasua JR. Infrared Spectrum of Poly (L-lactide): Application to Crystallinity Studies. *Macromolecules* 2006;39:9291–301.
- [418] Meaurio E, Martinez De Arenaza I, Lizundia E, Sarasua JR. Analysis of the C=O stretching band of the β -crystal of poly(L-lactide). *Macromolecules* 2009;42:5717–27.
- [419] Meaurio E, Zuza E, López-Rodríguez N, Sarasua JR. Conformational behavior of poly(L-lactide) studied by infrared spectroscopy. *J Phys Chem B* 2006;110:5790–800.

- [420] Zhang J, Duan Y, Sato H, Tsuji H, Noda I, Yan S, et al. Crystal Modifications and Thermal Behavior of Poly(l-lactic acid) Revealed by Infrared Spectroscopy. *Macromolecules* 2005;38:8012–21.
- [421] Zhang J, Tsuji H, Noda I, Ozaki Y. Weak Intermolecular Interactions during the Melt Crystallization of Poly(l-lactide) Investigated by Two-Dimensional Infrared Correlation Spectroscopy. *J Phys Chem B* 2004;108:11514–20.
- [422] Savitzky A, Golay MJE. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Anal Chem* 1964;36:1627–39.
- [423] Steinier J, Termonia Y, Deltour J. Smoothing and differentiation of data by simplified least square procedure. *Anal Chem* 1972;44:1906–9.
- [424] Luo J, Ying K, He P, Bai J. Properties of Savitzky–Golay digital differentiators. *Digit Signal Process* 2005;15:122–36.
- [425] Pan P, Yang J, Shan G, Bao Y, Weng Z, Cao A, et al. Temperature-Variable FTIR and Solid-State ^{13}C NMR Investigations on Crystalline Structure and Molecular Dynamics of Polymorphic Poly(L-lactide) and Poly(L-lactide)/Poly(D-lactide) Stereocomplex. *Macromolecules* 2012;45:189–97.
- [426] Sarra-Bournet C, Ayotte G, Turgeon S, Massines F, Laroche G. Effects of Chemical Composition and the Addition of H_2 in a N_2 Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Discharge on Polymer Surface Functionalization. *Langmuir* 2009;25:9432–40.
- [427] Öteyaka MÖ, Chevallier P, Turgeon S, Robitaille L, Laroche G. Low Pressure Radio Frequency Ammonia Plasma Surface Modification on Poly(ethylene terephthalate) Films and Fibers: Effect of the Polymer Forming Process. *Plasma Chem Plasma Process* 2012;32:17–33.

- [428] Massines F, Gouda G, Gherardi N, Duran M, Croquesel E. The Role of Dielectric Barrier Discharge Atmosphere and Physics on Polypropylene Surface Treatment. *Plasmas Polym* 2001;6:35–49.
- [429] Sherman JR, Daniel M. The transition from a filamentary dielectric barrier discharge to a diffuse barrier discharge in air at atmospheric pressure. *J Phys D Appl Phys* 2005;38:547.
- [430] Chevallier P, Castonguay M, Turgeon S, Dubrulle N, Mantovani D, McBreen PH, et al. Ammonia RF-Plasma on PTFE Surfaces: Chemical Characterization of the Species Created on the Surface by Vapor-Phase Chemical Derivatization. *J Phys Chem B* 2001;105:12490–7.
- [431] ASTM. Standard Test Methods for Loop Tack. D6195 - 03. 2011:5.
- [432] Steinman DA, Vinh B, Ethier CR, Ojha M, Cobbold RSC, Johnston KW. A numerical simulation of flow in a two-dimensional end-to-side anastomosis model. *J Biomech Eng* 1993;115:112–8.

Annexe I. Nanofibres de PLA filées par jet d'air modifiées possédant une surface hydrophile clivable par réduction pour le génie tissulaire vasculaire : synthèse et modification de surface

Air-spun PLA nanofibers modified with reductively-sheddable hydrophilic surfaces for vascular tissue engineering: synthesis and surface modification

Nare Ko^{1,#}, Gad Sabbatier^{1,2,#}, Alexander Cunningham¹, Gaétan Laroche^{1,*}, Jung Kwon Oh^{1,*}

¹ Department of Chemistry and Biochemistry and Center for NanoScience Research, Concordia University, H4B 1R6, Montreal, Quebec, Canada

² Laboratoire d'Ingénierie de Surface, Centre de Recherche sur les Matériaux Avancés, Département de génie des mines, de la métallurgie et des matériaux, Université Laval, Québec (QC), G1V 0A6, Canada.

³ Laboratoire de Physique et Mécanique Textile, Université de Haute Alsace, École Nationale Supérieure d'Ingénieurs du Sud Alsace, 68093 Mulhouse cedex, France

Published in Macromolecular Rapid Communications

February 2014

* Corresponding Authors : Gaétan Laroche, Laboratoire d'Ingénierie de Surface, Centre de recherche du CHU de Québec, Hôpital St-François d'Assise, 10 rue de l'Espinay, Québec G1L 3L5 Québec, Canada. E-mail: gaetan.laroche@gmn.ulaval.ca. Jung Kwon Oh, Department of Chemistry and Biochemistry, Concordia University, 7141 Sherbrooke St. West Montreal, H4B 1R6 Quebec, Canada. E-mail: jo@alcor.concordia.ca. [#] These authors has contributed equally.

1. Résumé

La famille des acides poly (lactique) s (PLA) est considérée comme niche de matériaux de prédilection pour plusieurs applications biomédicales, particulièrement dans le domaine de l'ingénierie tissulaire vasculaire où ils peuvent être utilisés en tant que réseau fibreux recouvrant la surface interne des prothèses vasculaires. Cependant, la surface hydrophobe des PLAs conduit à des interactions biologiques non-spécifiques qui limitent leur utilisation. Dans le but de résoudre ce défi, nous nous proposons de développer de nouvelles nanofibres avec des propriétés de surfaces hydrophiles. La polymérisation radicalaire par transfert d'atome initiée par la surface permet de greffer des oligo (oxyde d'éthylène)-contenant des polyméthacrylate (OEOMA) à partir des nanofibres de PLA filées par jet d'air modifiées avec des groupements disulfures. Les fibres de PLA-SS-OEOMA résultant de cette méthode montrent une meilleure stabilité thermique et une amélioration des propriétés de surface, même après le clivage des ponts disulfures par réaction de réduction sensibles aux thiols coupant l'OEOMA hydrophile.

2. Abstract

Poly lactide is a class of promising biomaterials that hold a great promise for various biological and biomedical applications, particularly, vascular tissue engineering as fibrous mesh to coat inside vascular prosthesis. However, their hydrophobic surface to non-specific interactions and limited ability to further modification are challenging. Here, we report the development of new air-spun PLA nanofibers modified with hydrophilic surfaces exhibiting reduction response. Surface-initiated atom transfer radical polymerization allows for grafting pendant oligo(ethylene oxide)-containing polymethacrylate (POEOMA) from PLA air-spun fibers labeled with disulfide linkages. The resulting POEOMA-g-PLA fibers exhibit enhanced thermal stability and improved surface properties, as well as thiol-responsive shedding of hydrophilic POEOMA by the cleavage of disulfide linkages in response to reductive reactions, thus tuning the surface properties.

3. Graphic abstract

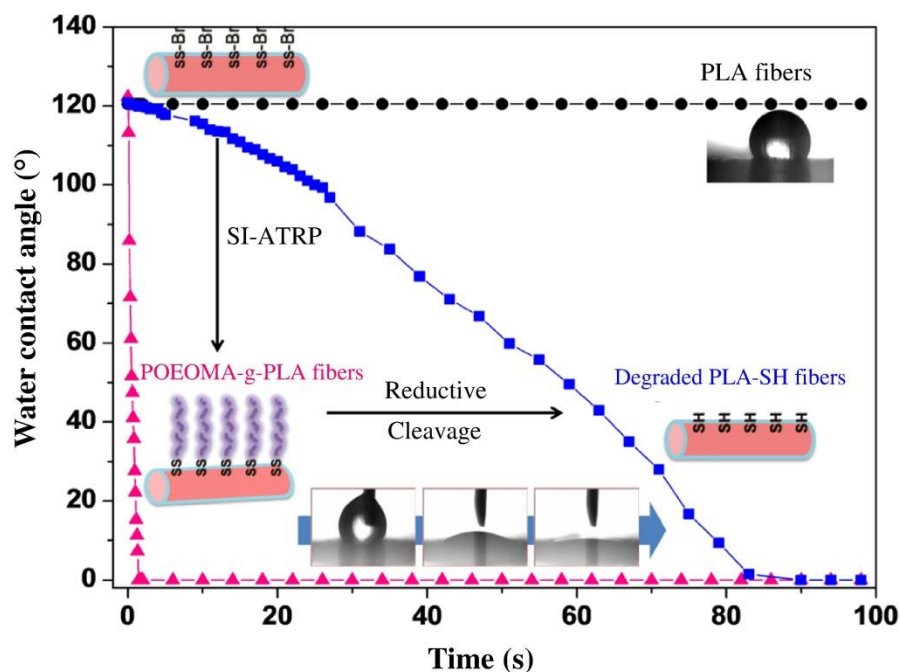


Figure 56. Résumé graphique de l'annexe I

New polylactide nanofibers modified with reduction-responsive sheddable hydrophilic surfaces by surface-initiated atom transfer radical polymerization, exhibiting enhanced thermal stability and improved surface properties, as well as thiol-responsive shedding, thus offering versatility in vascular surgery applications.

Keywords: atom transfer radical polymerization, ring opening polymerization, PLA, air-spining, thiol-disulfide degradation

4. Introduction

Poly(lactide) (PLA), along with polycaprolactone and polyglycolide, is a class of hydrophobic aliphatic polyesters based on hydroxyalkanoic acids [342,343]. These polyesters are biocompatible, biodegradable by enzymatic reactions or hydrolysis in physiological conditions, and used in FDA-approved medical devices. They also exhibit low immunogenicity and good mechanical properties. Being facilitated with these biological properties, PLA and their copolymers are processed to various formats [344]; a promising format is nanofibers fabricated by electrospinning or air-spinning, efficient processing methods to manufacture long fiber structures. Air-spinning is an alternative process to classical electrospinning, based on stretching of polymer solutions with a high speed air flow. These fibrous materials possess large surface areas, high porosity, and interconnected network structures. These unique properties have promoted the use of PLA-fibers as useful biomaterials as sutures, implants for bone fixation [176], drug delivery vehicles [345–347], and tissue engineering scaffolds [348–350]. Recently, air-spun PLA-fibers have found their applications as biomaterials to coat luminal wall of commercial vascular grafts in vascular surgery.

Vascular grafts are used to replace, bypass, or maintain function of damaged, occluded or diseased blood vessels in small, medium and large diameter. Poly(ethylene terephthalate) (PET) is one of the commercially-available materials for textile vascular prostheses. PET is usually coated with proteins such as gelatin or collagen to prevent blood loss through prosthesis wall [351]. A drawback for the impregnation of proteins involves a dramatic decrease in patency rate with smaller diameters [352]. The use of PLA-based nanofibrous mesh enable to circumvent the problem as well as promote good endothelial cell proliferation in monolayers on the PLA-fiber mesh [159,160]. Moreover, surface properties (roughness, hydrophilicity, inertia...) are directly related to immune responses and blood coagulation activation [353]. Despite these advances, however, several challenges for the use of conventional PLA-fiber mesh to be addressed remain. One challenge is their hydrophobic surface causing non-specific interactions with proteins in the blood. Meanwhile, the increase of hydrophilicity improves the surface inertia and consequently,

the hemocompatibility. Another challenge involves their limited ability to further conjugation or modification of their surfaces due to their lack of functionalities. Surface modification of PLA nanofibrous materials with chemical functions, desirably hydrophilicity, or biomolecules could strongly enhance their applicability toward the successful vascular tissue engineering applications.

Several approaches to surface modification of nanofibrous materials have been reported. Click-type orthogonal reactions have been used for enhanced specific protein adhesion [354] and anti-fouling properties [355]. Surface-initiated (SI) atom transfer radical polymerization (ATRP) [337] has also been explored. The SI-ATRP technique allowed for adjusting the surface properties of fibrous materials of polystyrene, PET, PLA, and cellulose. This “grafting from” method was conducted directly from bromine-terminated polystyrene fibers in aqueous solution [356]. However, for most of the fibrous materials, post-immobilization of small molecular weight ATRP initiating species into as-synthesized fibers through either physical absorption [357] or covalent attachment is required prior to SI-ATRP [358,359].

Stimuli-responsive degradation (SRD) is a dynamic and powerful platform that involves the cleavage of covalent bonds in response to external stimuli [360,361]. Particularly, disulfides are cleaved to the corresponding thiols in response to reductive reactions [362,363], enabling enhanced release [364], changing morphologies [365], or tuning lower critical solution temperature [366,367]. This unique disulfide-thiol chemistry has been explored to develop a variety of reductively-responsive degradable nanomaterials desirable for various biomedical applications. Typical examples include self-assembled micellar nanocarriers [368,369], nanocapsules [370], nanogels [371–373], hydrogels [374,375], and bioconjugates [376–378]. Further, PLA fibers modified with sheddable hydrophilic polymers that can undergo reductively-responsive cleavage would be interesting as smart coating materials in constructing PET-based vascular prostheses with tunable surfaces of hydrophobicity and hydrophilicity.

Herein, we report new air-spun PLA nanofibers whose surfaces are modified with reductively-sheddable hydrophilic surfaces as versatile coating biomaterials for vascular surgery. Figure 57 illustrates our approach to synthesis and surface modification of reductive-responsive PLA fibers labeled with disulfide linkages. High molecular weight PLA-ss-Br homopolymers were first synthesized by ring opening polymerization (ROP) in the presence of a double-head initiator labeled with a disulfide (HO-ss-Br) and then processed to PLA-ss-Br fibers by air-spinning. As a proof-of-concept approach, pendant oligo(ethylene glycol)-containing polymethacrylate (POEOMA) was targeted to modify the surfaces of air-spun PLA fibers using a direct SI-ATRP to be hydrophilic. POEOMA is an analog of poly(ethylene oxide) (PEO); PEO is biocompatible material that has been FDA-approved for clinical use, has low toxicity, and prevents nonspecific protein adsorption [379,380]. The successful grafting of POEOMA from PLA fibers enabled improved thermal stability and surface properties. Further, the reductive cleavage of disulfide linkages resulted in shedding hydrophilic POEOMA from POEOMA-g-PLA fibers, adjusting their surface properties.

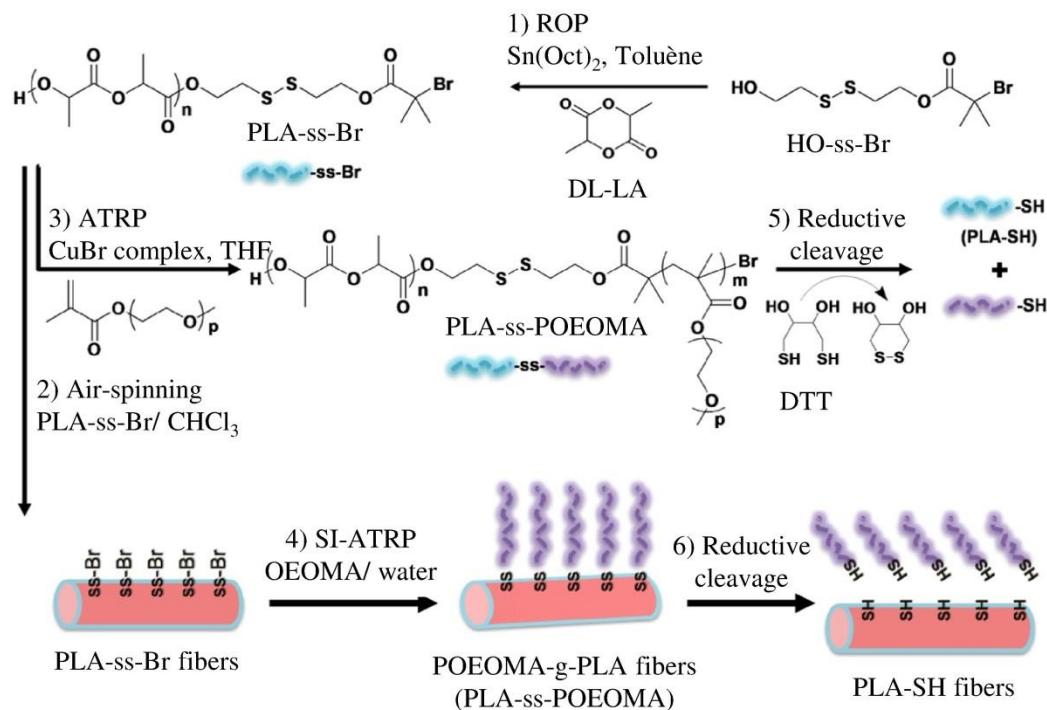


Figure 57. Illustration of our approach to synthesize redox-responsive POEOMA-g-PLA fibers based on PLA-ss-POEOMA block copolymers having disulfides at block junctions using surface-initiated atom transfer radical polymerization of OEOMA in the presence of PLA-ss-Br fibrous macroinitiators and their degradation in response to reductive reactions.

5. Results and Discussion

The synthesis of HO-ss-Br double-head initiator for both ROP and ATRP is described in our previous publication [381]. In the presence of HO-ss-Br, a series of ROP of D,L-lactide (LA) mediated with tin(II) 2-ethylhexanoate ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$) in toluene at 120 °C was conducted. The results are summarized in Table S1, where the samples are denoted as PLA-x (x: serial number). First, ROP with the targeting degree of polymerization (DP) = 70 defined as the initial mole ratio of $[\text{LA}]_0/[\text{HO-ss-Br}]_0 = 70/1$ yielded PLA-ss-Br homopolymer (PLA-1) with relatively low molecular weight, the number average molecular weight (M_n) = 27.6 kg/mol and narrow molecular weight distribution, $M_w/M_n =$

1.06. As seen in Figure 61, its gel permeation chromatography (GPC) trace shows a shoulder in high molecular weight region. Peak analysis using a deconvolution method suggests the content of high molecular weight species (HMS) to be 16%. The formation of HMS could be attributed to undesirable side reactions [382]. In an effort to synthesis of high molecular weight PLA-ss-Br with less HMS content, the important parameters such as targeting DP and $[\text{Sn}(\text{Oct})_2]_0/[\text{HO-ss-Br}]_0$ ratio were varied. When the targeting DP increased to 500 and 1000, relatively high molecular weight PLA-ss-Br homopolymers with $M_n = 65 - 75$ kg/mol were obtained with longer polymerization time. However, the undesirable HMS content also increased up to 41%. When the amount of $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ increased, polymerization was fast and the HMS contents also increased (PLA-7 and PLA-8 with targeting DP = 1000) (Figure 62). Further increase in targeting DP = 2000 with $[\text{Sn}(\text{Oct})_2]_0/[\text{HO-ss-Br}]_0 = 0.14/1$ yielded high molecular weight PLA-9 with $M_n = 75.6$ kg/mol and HMS = 15%. These results suggest that the balance of targeting DP, polymerization time, and $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ content is required for the synthesis of high molecular weight PLA-ss-Br with less HMS content.

Next, air-spinning of the PLA-ss-Br homopolymers dissolved in chloroform was examined. Chloroform is a good solvent to PLA, volatile, and advantageous for spinning purposes. Three homopolymers with different molecular weights, but HMS content < 20%, were selected: PLA-1 ($M_n = 27.6$ kg/mol), PLA-6 ($M_n = 35$ kg/mol), and PLA-9 ($M_n = 75.6$ kg/mol) (see their GPC traces in Figure 61). PLA-1 and PLA-6 with relatively low molecular weights ($M_n < 40$ kg/mol) were not well air-spun, even at as high as 70% concentration. Scanning electron microscopy (SEM) images in Figure 63 show the presence of some fibers, but mostly large spheres. Such poor spinnability could be attributed to relatively low molecular weight PLAs, and thus lower solution viscosities even at higher concentrations. Promisingly, PLA-9 with $M_n > 70$ kg/mol was fabricated through entanglement of PLA chains to fibrous woven at 30% concentration (Figure 58A and 58C). The average diameter was estimated to be 495 ± 240 nm from approximately 150 fibers (Figure 64).

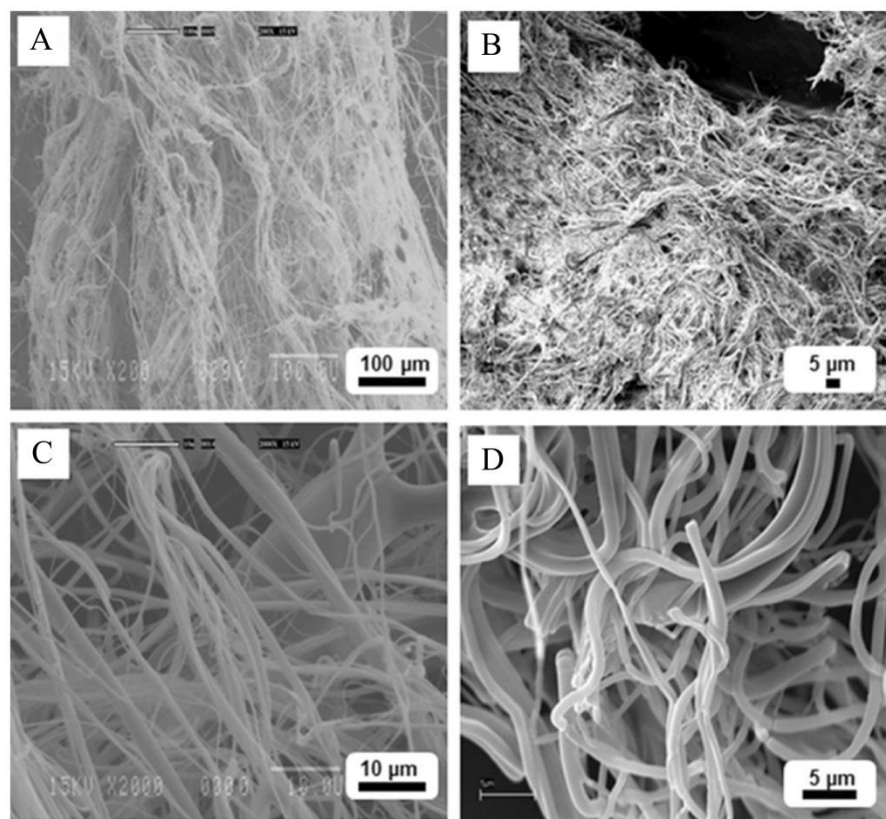


Figure 58. SEM images of PLA-9 fibers ($M_n = 75.6$ kg/mol) (A, C) and POEOMA-g-PLA BCP-3/fibers (B, D) with lower (A, B) and higher (C, D) magnitudes.

The resulting PLA-ss-Br fibers consist of terminal Br groups. In the presence of PLA-ss-Br fibers, SI-ATRP of OEOMA was investigated to synthesize POEOMA grafted from PLA fibers (POEOMA-g-PLA fibers) based on PLA-ss-POEOMA block copolymers (BCPs) consisting of disulfide linkages at the junctions of PLA and POEOMA blocks. Table 7 summarizes the results. To see the availability of terminal Br groups in PLA-ss-Br homopolymer fibers, their chain extension was first examined with OEOMA300 with MW = 300 g/mol (BCP-1) and OEOMA950 with MW = 950 g/mol (BCP-2) in homogeneous solution. Aliquots of the dried fibers, OEOMA, and CuBr complex were dissolved in tetrahydrofuran under direct ATRP conditions for 2 hrs. Conversion was determined to be 0.14 for BCP-1 and 0.07 for BCP-2. After purification, their $^1\text{H-NMR}$ spectra show typical peaks at 5.0-5.2 ppm (a) corresponding to methine protons in PLA and 0.9-1.0 ppm (b) to

backbone methyl protons in POEOMA (Figure 59B for BCP-1 and Figure 65 for BCP-2). From the integral ratio of these peaks $[(b/3)/(a/2)]$, the weight ratio of POEOMA/PLA in BCPs was calculated to be 0.22/1 for BCP-1 and 0.42/1 for BCP-2. These values are close to those calculated using the wt ratio of OEOMA/PLA from the recipe and the determined conversion (Table 7). GPC traces of the purified BCPs evolved to higher molecular weight region. For example, M_n increased from 71.4 kg/mol to 82.0 kg/mol for BCP-1 (Figure 66). These $^1\text{H-NMR}$ and GPC results indicate the successful synthesis of PLA-ss-POEOMA BCPs in homogeneous solutions, confirming the presence of terminal Br groups in PLA-ss-Br homopolymer fibers.

With the promising results, grafting POEOMA from PLA-ss-Br fibers through SI-ATRP in aqueous solution was next examined. Solubility test reveals that PLA fibers remained intact in aqueous solution of OEOMA950, while they were dissolved in aqueous solution of OEOMA300 even at room temperature. Consequently, PLA fibrous mesh was soaked in a solution consisting of OEOMA950, Cu complex, and water for 2 hrs. SI-ATRP was then conducted for 2 hrs at 30 °C, below the glass transition point of amorphous PLA (≈ 39 °C). The resulting products were purified by extensive dialysis using a dialysis tubing ($MWCO = 12$ kg/mol) to completely remove unreacted OEOMA950 monomers. $^1\text{H-NMR}$ spectrum shows the typical peaks (b) at 0.9-1.0 ppm for POEOMA and 5.0-5.2 ppm (a) for PLA (Figure 59C). The wt ratio of POEOMA/PLA was calculated to be 0.13/1 (Table 7). Further, the GPC trace of the purified BCP slightly evolved to higher molecular weight region (Figure 67). These results suggest the successful grafting POEOMA from PLA fibers, yielding POEOMA-g-PLA fibers (BCP-3/fibers) based on PLA-ss-POEOMA BCPs.

Table 7: Characteristics and molecular weight data of PLA-ss-POEOMA BCPs synthesized by chain extension of PLA-ss-Br fibers with POEOMA under normal ATRP conditions.

Entry	BCP-1	BCP-2	BCP-3/fibers
PLA fiber (mg)	276	208	198
OEOMA/PLA (wt/wt)	1.5/1	4.8/1	4.8/1
OEOMA [M]	0.53	0.50	0.60
CuBr [mM]	5.3	5.0	6.3
OEOMA monomer	OEOMA300	OEOMA950	OEOMA950
Solvent	THF	THF	water
Time (hrs)	6	2	2
Conv ^{a)}	0.14	0.06	NA
POEOMA/PLA (wt/wt) _{,theo} ^{b)}	0.21/1	0.35/1	NA
POEOMA/PLA (wt/wt) ^{c)}	0.22/1	0.42/1	0.13/1
M _n (g/mol) ^{d)}	82,000	77,200	67,200
M _w /M _n ^{d)}	1.11	1.14	1.13

a) Determined by ¹H-NMR.

b) Estimated by OEOMA/PLA wt ratio x conversion

c) Determined by ¹H-NMR with molecular weight of LA and OEOMA

d) Derermined by GPC with DMF as an eluent.

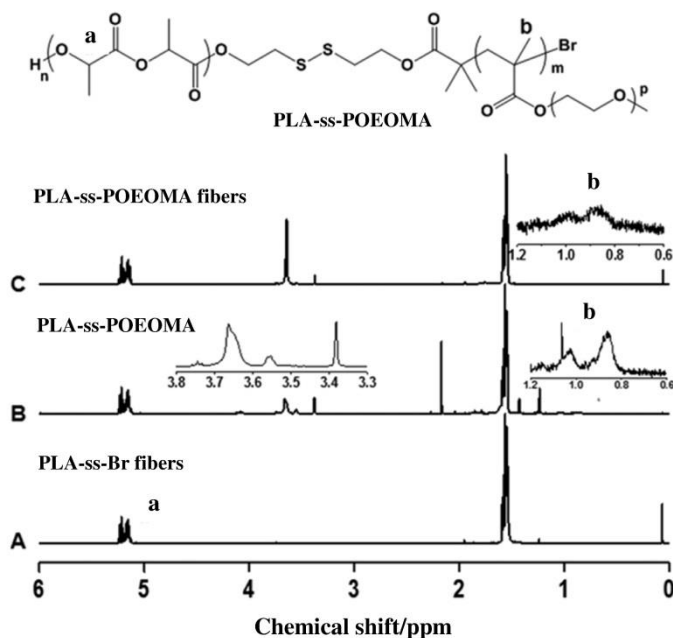


Figure 59. ¹H-NMR spectra of PLA-9 (A), BCP-1 (B), and BCP-3/fibers (C) in CDCl₃.

Further, the effect of the grafted POEOMA chains was evaluated on fibrous morphologies by SEM, thermal properties using thermogravimetric analysis (TGA), surface properties using contact angle measurements. SEM images show a relatively dense fibrous form (Figure 58B and 58D). The average diameter of the POEOMA-g-PLA fibers was estimated to be 620 ± 220 nm, larger than pristine PLA fibers by approximately 122 nm (Figure 64). Figure 68 shows TGA data of the weight loss of BCP-3/fibers, compared with PLA-9 fibers and PEO homopolymers as controls, upon heating. For BCP-3/fibers, the major weight loss started at 236 °C. This temperature is lower than that (315 °C) for PEO homopolymers, but higher than that (215 °C) by 20 °C for PLA fibers. This result suggests that the tethered POEOMA enhances thermal stability of PLA fibers. Figure 60 shows the results of contact angle measurements with snapshots of water drops on PLA fibrous mesh before and after surface modification with POEOMA. On POEOMA-g-PLA fibers, water drops were immediately absorbed into fibers within 1.5 sec, resulting in sharp decrease in contact angle (Figure 60A). The disappearance of a water drop on BCP fibers was snapshotted in Figure 60B. On hydrophobic PLA homopolymer fibers, however, water drops stayed with a contact angle at 120.5 ° over time (Figure 60C). This result suggests that the tethered hydrophilic POEOMA increases wettability of hydrophobic PLA fibers, allowing an instantaneous penetration of water, whereas the pristine PLA fibers offered a significant barrier to it. Similar results are reported for other fibrous materials with different chemical structures [354,357].

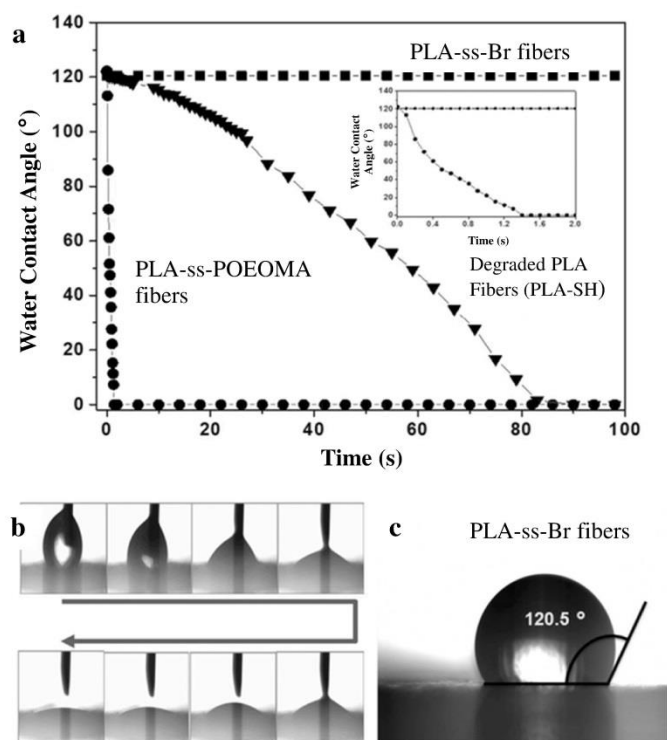


Figure 60. Evolution of contact angle on PLA fibers, POEOMA-g-PLA fibers before and after treatment with DTT (A), and snapshots of water droplets on POEOMA-g-PLA fibers after SI-ATRP (B) and PLA-ss-Br fibers in the pristine state (C). Inset of (A): evolution of contact angle on PLA fibers and POEOMA-g-PLA fibers before DTT treatment.

The POEOMA-g-PLA fibers based on PLA-ss-POEOMA BCPs contain disulfides at block junctions. These disulfide linkages could be cleaved in the presence of DTT, a reducing agent, to the corresponding thiols including POEOMA-SH and PLA-SH as linear polymers or fibers (Figure 59). GPC results indicate the decrease in molecular weight of PLA-3/fibers from $M_n = 71.8$ kg/mol to $M_n = 67.0$ kg/mol in homogeneous DMF solution with excess DTT (Figure 69). $^1\text{H-NMR}$ was also used to examine the disulfide cleavage in aqueous solution where BCP-3/fibers exist as meshes. In the presence of excess DTT, the typical peaks at 0.9-1.0 ppm corresponding to backbone methyl protons in POEOMA completely disappeared, while being retained in the absence of DTT (Figure 70). These GPC and NMR results suggest the significant cleavage of disulfide linkages in reducing

environments. Such cleavage could result in shedding POEOMA-SH from POEOMA-g-PLA fibers, thus changing the surface polarity of PLA fibers. As seen in Figure 60A, water contact angle on the resulting PLA-SH fibers slowly decreased. After 80 sec, water droplet was completely absorbed in the fibers. Such slow decrease is attributed to the surface of the resulting PLA-SH fibers to be less hydrophilic than POEOMA-g-PLA fibers, but more hydrophilic than pristine PLA fibers.

6. Conclusion

A new class of air-spun PLA nanofibers modified with thiol-responsive sheddable POEOMA was synthesized by a combination of ROP, air-spinning, and SI-ATRP techniques. High molecular weight PLA-ss-Br with less HMS contents (<15%) ensured good spinability, yielding PLA fibers functionalized with terminal Br groups at interfaces. SI-ATRP allowed for the modification of the PLA fibers with tethered hydrophilic POEOMA blocks. The resulting POEOMA-g-PLA fibers with hydrophilic surfaces exhibit improved thermal stability and surface properties such as water content and wetting behavior, confirmed by SEM, TGA, and contact angle measurements. Moreover, shedding hydrophilic POEOMA from POEOMA-g-PLA fibers by the cleavage of disulfide linkages in response to reductive reactions enabled tuning the surface properties. Toward vascular tissue engineering, the controlled and enhanced release of therapeutics upon the cleavage of disulfide linkages in response to reductive reactions [383] of the new POEOMA-g-PLA fibrous mesh as well as by varying hydrophobicity driven by their nanostructures fabricated on PET films [384] is currently under investigation.

7. Acknowledgments

Financial supports from NSERC Canada, Canada Research Chair (CRC) Award, and Centre Québécois sur les Matériaux Fonctionnels (CQMF) funded by FQRNT are gratefully acknowledged. JKO is a Tier II CRC in Nanobioscience. Both GL and JKO are members of CQMF. Authors thank Dr N. Chan for synthesis of TPMA ligand as well as Dr R. Schmidt and Z. Zarafshani for helpful discussions.

8. Supporting information

8.1 Experimental

Instrumentation and analyses. ^1H -NMR spectra were recorded using a 500 MHz Varian spectrometer. The CDCl_3 singlet at 7.26 ppm was selected as the reference standard. Molecular weight and molecular weight distribution were determined by gel permeation chromatography (GPC) with an Agilent 1260 Infinity Isocratic Pump and a refractive index (RI) detector. Two Agilent columns (PLgel mixed-D and mixed-C) were used with DMF containing 0.1 mol% LiBr at 50 °C at a flow rate of 1.0 mL/min. Linear polystyrene (PSt) standards were used for calibration. Aliquots of polymer samples were dissolved in DMF/LiBr and the clear solutions were filtered using a 0.25 μm PTFE filter to remove any THF-insoluble species. A drop of anisole was added as a flow rate marker.

Scanning Electron Microscopy (SEM). Nanofiber samples were gold-coated and observed with a scanning electron microscope. Nanofiber images were taken using either an EVO® 50 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) equipped with an Everhart-Thornley secondary electron detector at a 10kV accelerating voltage or a Jeol JSM32CF (Soquelec, Montréal, QC, Canada) at a 15kV accelerating voltage. Each image was analyzed with image treatment software (Image J, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Diameters of fibers were measured on images at 10000x magnification. A total of approximately 150 fibers were randomly selected for each sample.

Thermogravimetric analysis (TGA). TGA measurements were carried out using a TA instruments Q50 analyzer. Typically, aliquots of dried PLA-ss-Br, POEOMA-g-PLA fibers, and PEOH as a control (5-10 mg) were placed in a platinum pan inside a programmable furnace. The sample was heated from 25 to 500 °C at a heating rate of 10 °C/min under nitrogen flow. Mass loss was then calculated.

Water contact angle measurements. Contact angles on PLA and POEOMA-g-PLA fibrous meshes were measured by sessile drop contact angles of water droplets (1 μL) using a home-made instrument. Drop-shape images were recorded at 10 x magnification using a

280

digital camera (Evolution VF cooled monochrome cooled camera, Media Cybernetics Inc.). ImageJ with Marco Brugnara's contact angle plugin was used to determine the contact angle.

Materials. 3,6-Dimethyl-1,4-dioxane-2,5-dione (DL-lactide, LA), tin(II) 2-ethylhexanoate ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$, 95%), *N,N,N',N'',N''*-pentamethyldiethylenetriamine (PMDETA, >98%), copper(I) bromide (CuBr , >99.99%), and poly(ethylene oxide monomethyl ether) (PEOH) with MW = 2,000 g/mol from Aldrich and DL-dithiothreitol (DTT, 99%) from Acros Organics were purchased and used as received. Oligo(ethylene glycol) monomethyl ether methacrylate (OEOMA) with MW = 300 g/mol (#EO units $\approx$ 5) for OEOMA300 and MW = 950 g/mol (#EO units $\approx$ 23) for OEOMA950 were purchased from Aldrich and purified by passing them through a column filled with basic alumina to remove the inhibitors. 2-Hydroxyethyl-2'-(bromoisobutyryl)ethyl disulfide (HO-ss-Br) was synthesized as described elsewhere [381]. Tris(2-pyridylmethyl)amine (TPMA) was synthesized according to literature procedure [385].

Synthesis of well-controlled PLA-ss-Br homopolymers by ROP. A series of ROP of LA was conducted in the presence of HO-ss-Br and $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ in toluene at 120 °C under various conditions. A typical procedure to synthesize high molecular weight PLA-9 under the initial mole ratio of $[\text{LA}]_0/[\text{HO-ss-Br}]_0/[\text{Sn}(\text{Oct})_2]_0 = 2000/1/0.14$ (Table S1) is as follows; HO-ss-Br (10.5 mg, 30 μmol), LA (10 g, 69.4 mmol), $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ (2 mg, 4.9 μmol), and toluene (6 mL) were added to a 25 mL Schlenk flask. The resulting mixture was deoxygenated by three freeze-pump-thaw cycles. The reaction flask was filled with nitrogen, thawed, and then immersed in an oil bath preheated to 120 °C to start the polymerization. After 22 hrs, the polymerization was stopped by cooling down to room temperature. The resulting homopolymer was then precipitated from MeOH for 12 hrs, isolated by vacuum filtration, and washed with MeOH several times. Well controlled PLA-ss-Br was then dried in a vacuum oven at 50 °C overnight, resulting in white solids: molecular weight data, $M_n = 75,600$ g/mol and $M_w/M_n = 1.13$.

Preparation of air-spun PLA-ss-Br nanofibers. The purified, dried PLA-ss-Br homopolymers were dissolved in chloroform (99.8%, Laboratoire Mat, Québec, QC, Canada). The resulting clear solutions were then injected into an air-spinning device set with the previously optimized parameters of air pressure = 5 MPa, flow rate = 10 mL/hr, needle diameter = 0.25 mm.

Synthesis of PLA-ss-POEOMA BCPs in THF by ATRP. The dried, purified PLA fibers (0.28 g), OEOMA300 (0.41 g, 1.38 mmol), PMDETA (2.9 μ L, 14 μ mol), and THF (2.6 mL) were mixed in a 10 mL Schlenk flask. The resulting mixture was deoxygenated by three freeze-pump-thaw cycles. The reaction flask was filled with nitrogen and CuBr (2.0 mg, 14 μ mol) was then added to the frozen solution. The flask was sealed, purged with vacuum and backfilled with nitrogen. The mixture was thawed and then the flask was immersed in an oil bath preheated to 47 °C to start the polymerization. The polymerization was stopped at 6 hrs by exposing the reaction contents to air.

For the synthesis of PLA-ss-POEOMA950, a similar procedure with the use of the purified PLA-fibers (0.21 g), OEOMA950 (1.0 g, 1.04 mmol), PMDETA (2.2 μ L, 10 μ mol), CuBr (1.5 mg, 10 μ mol), and THF (2.1 mL) was applied. To purify the resulting polymers, as-synthesized polymer solution was diluted in THF and then passed through a basic aluminum oxide column filled to remove residual copper species. The polymer solutions were precipitated from hexane and residual solvent was further removed using a vacuum oven at 50 °C overnight.

Synthesis of POEOMA-g-PLA fibers using surface-initiated ATRP. A mixture consisting of an aliquot of PLA fibrous mesh (0.21 g), OEOMA950 (0.97 g, 1.0 mmol), TPMA (3 mg, 10 μ mol), and water (1.6 mL) in a 10 mL Schlenk flask was deoxygenated by three freeze-pump-thaw cycles. The reaction flask was filled with nitrogen and CuBr (1.5 mg, 10 μ mol) was then added to the frozen solution. The flask was sealed, purged with vacuum and backfilled with nitrogen. The mixture was thawed and then the flask was immersed in an oil bath preheated to 30 °C to start the polymerization. The polymerization was stopped at 2 hrs by exposing the reaction contents to air. To purify the resulting

product fibers by removal of residual copper species and unreacted monomers, the as-synthesized mixtures were placed in a dialysis tubing with MWCO = 12,000 g/mol and dialyzed over water (500 mL) for over 2 days. The resulting fibers were then dried in a vacuum oven at 50 °C overnight.

DTT-responsive cleavage of disulfide linkages of PLA-ss-POEOMA in DMF. Aliquots of the purified, dried BCP-1 or BCP-3/fibers (10 mg) were dissolved in DMF (10 mL) to form clear solutions at 1 mg/mL. They were then mixed with 10 mM DTT under stirring for 5 days. The resulting mixtures were analyzed using GPC.

DTT-responsive cleavage of disulfide linkages of POEOMA-g-PLA fibers in aqueous solution. Aliquots of the purified, dried BCP-3/fibers (10 mg) were immersed in 10 mM aqueous DTT solution (10 mL) and water (10 mL) as a control for 5 days without stirring. Note that fibrous mesh were destroyed with even mild stirring. The resulting fibers were washed with water three times, and then dried in a vacuum oven at 50 °C for 2 days. They were then analyzed using ^1H -NMR and contact angle measurements.

Table 8: Characteristics and molecular weight data of PLA-ss-Br homopolymers synthesized by ROP of LA in the presence of HO-ss-Br in toluene at 120 °C under different conditions.

Entry	$[\text{LA}]_0/[\text{OH-ss-Br}]_0$	$[\text{Sn}(\text{Oct})_2]_0/[\text{OH-ss-Br}]_0$	Time (hrs)	M_n (g/mol)	M_w/M_n	HMS (%)
PLA-1	70	0.07	2	27,600	1.06	16
PLA-2	500	0.07	3	37,800	1.04	5
PLA-3	500	0.07	16	57,900	1.07	31
PLA-4	500	0.07	30	67,100	1.09	27
PLA-5	1,000	0.14	4	25,900	1.03	5
PLA-6	1,000	0.14	5	35,000	1.06	10
PLA-7	1,000	0.14	42	77,700	1.21	41
PLA-8	1,000	0.20	18	72,000	1.18	38
PLA-9	2,000	0.14	22	75,600	1.13	15

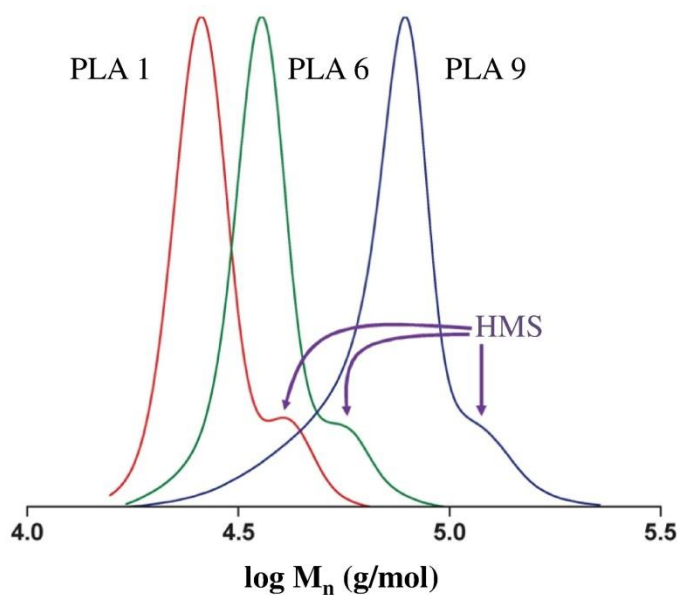


Figure 61. GPC traces of PLA-1 ($M_n = 27.6$ kg/mol), PLA-6 ($M_n = 35.0$ kg/mol), and PLA-9 ($M_n = 75.6$ kg/mol).

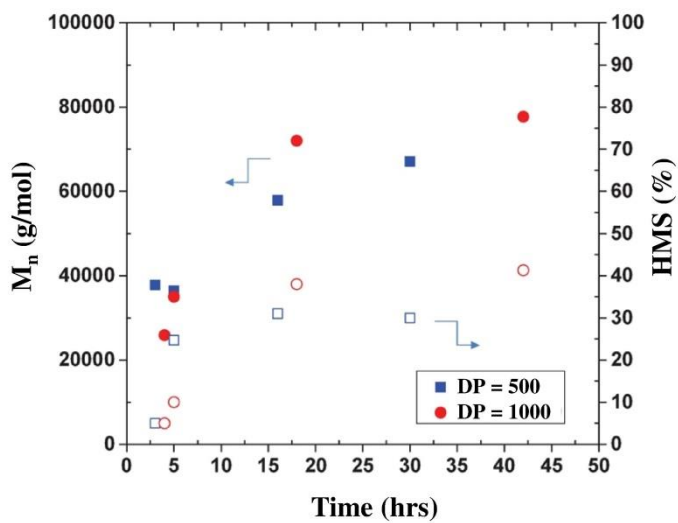


Figure 62. Evolution of molecular weights and HMS contents over polymerization time for ROP of LA with targeting DP = 500 and 1000, as summarized in Table 8.

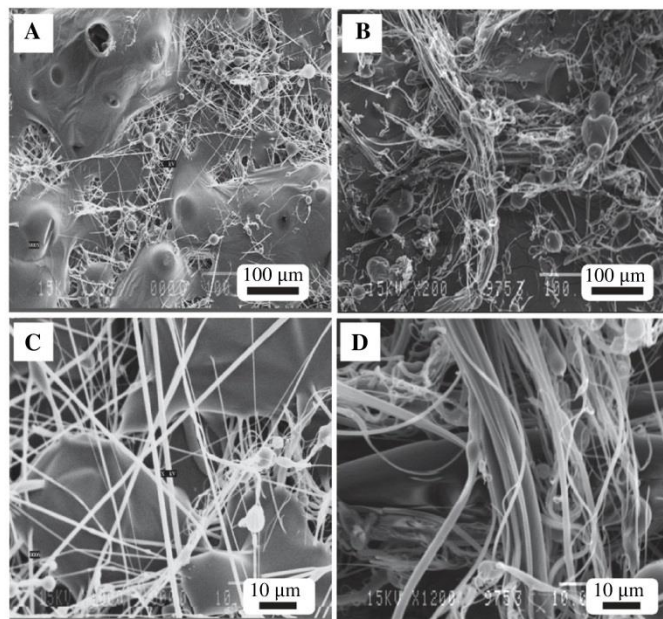


Figure 63. SEM images of low molecular weight PLA-1 ($M_n = 27.6$ kg/mol) (A, C) and PLA-6 ($M_n = 35.0$ kg/mol) (B, D) at lower (A, B) and higher (C, D) magnitudes.

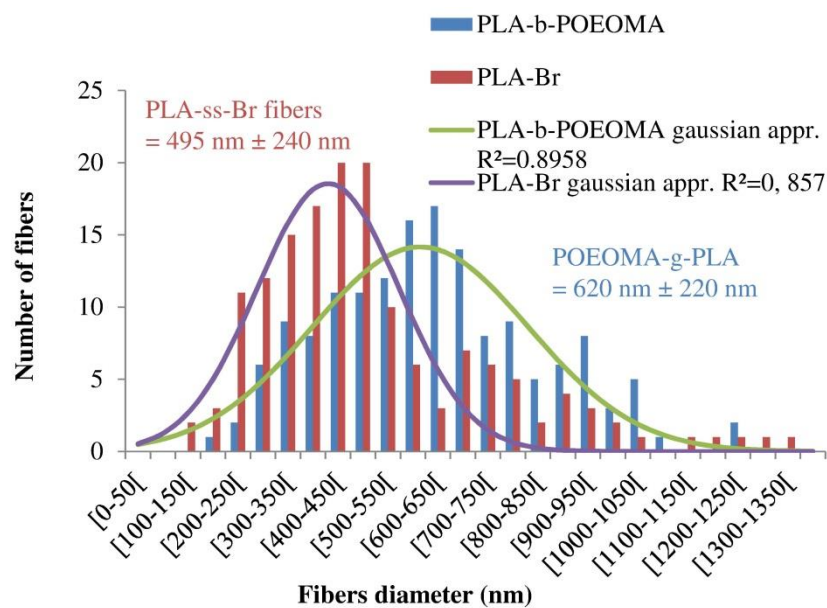


Figure 64. Size distribution in diameter of nanofibers of PLA-ss-Br and POEOMA-g-PLA fibers.

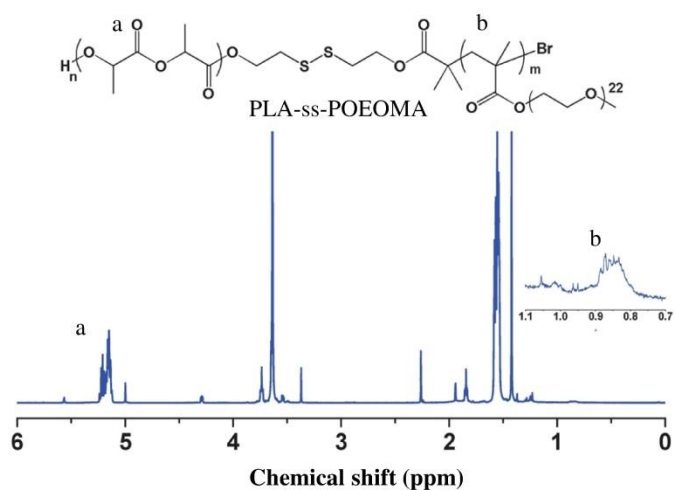


Figure 65. ^1H -NMR spectrum of PLA-ss-POEOMA BCP-2 in CDCl_3 .

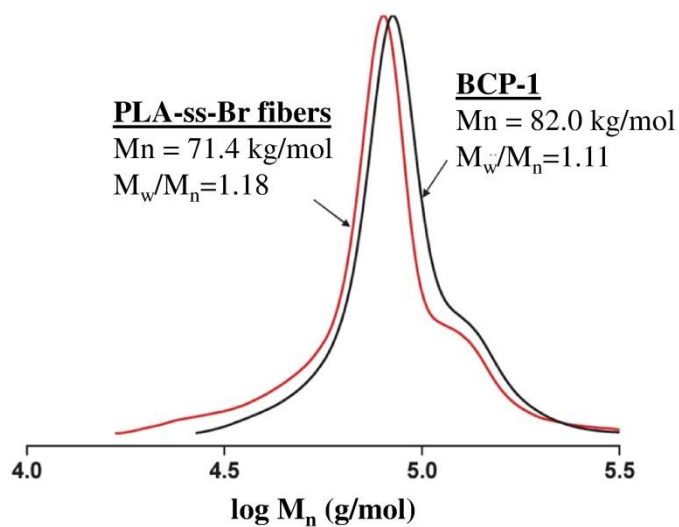


Figure 66. GPC traces of PLA-ss-Br fibers and PLA-ss-POEOMA300 (BCP-1) in DMF.

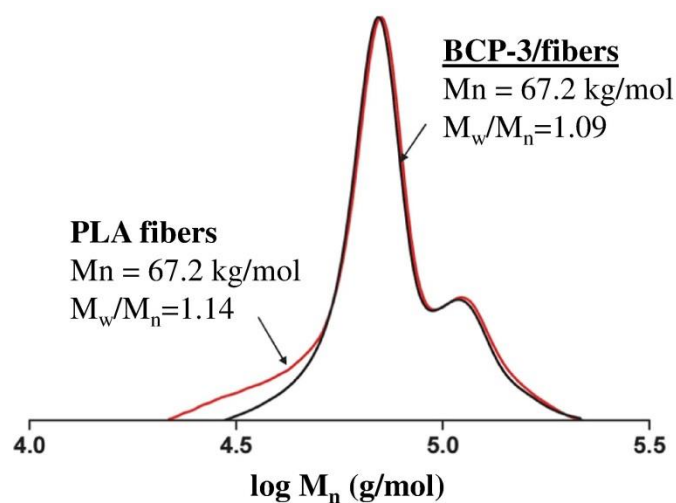


Figure 67. GPC traces of PLA-ss-Br fibers and POEOMA-g-PLA fibers based on PLA-ss-POEOMA950 (BCP-3/fibers) in DMF.

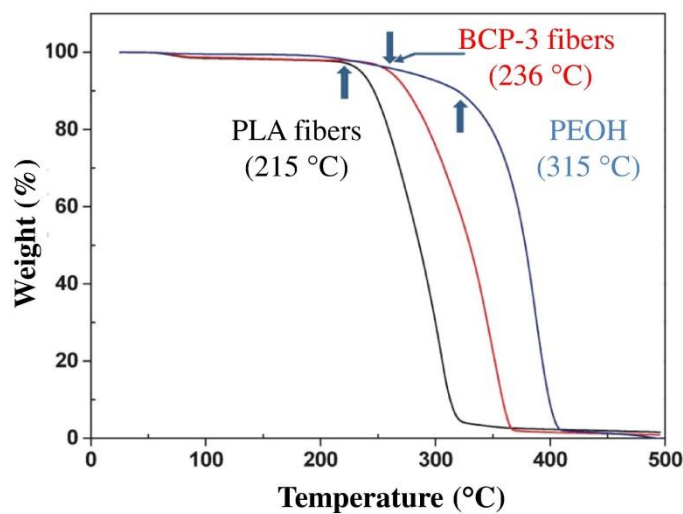


Figure 68. TGA diagrams of PLA-ss-Br fibers, BCP-3/fibers, and PEOH with MW = 2,000 g/mol for comparison. An arrow indicates a temperature where the major weight loss starts.

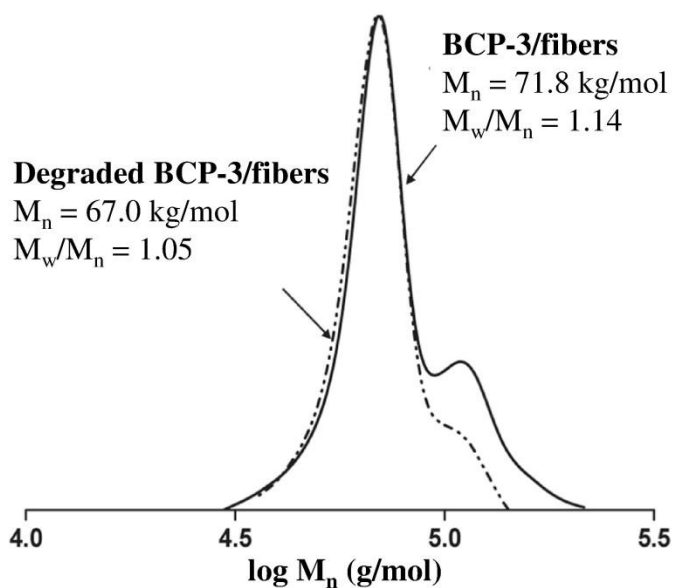


Figure 69. Reductive degradation of POEOMA-g-PLA fibers in DMF homogeneous solution monitored by GPC traces.

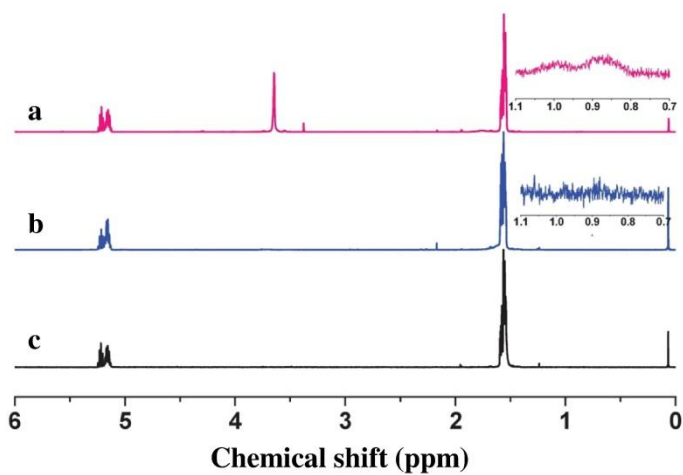


Figure 70. ^1H -NMR spectra of BCP-3/fibers in the absence (a) and presence (b) of excess DTT in water, compared with the spectrum of pristine PLA-ss-Br fibers (c) in CDCl_3 .

Annexe II. Analyse de la cristallinité des nanofibres de PLA par calorimétrie différentielle à balayage en modulation stochastique de température

1. Introduction

Le PLA est un polymère amorphe ou semi-cristallin qui offre une grande variété de taux de cristallinité selon les proportions de PLLA, de PDLA et de PDLLA [208]. Pour des conditions d'essais similaires, le taux d'isomères issu des dimères lactide L, D et DL dans le polymère a une grande influence sur les propriétés thermiques lié à la cristallinité. Par exemple, le PLLA peut atteindre un taux de cristallinité maximum d'environ 65%, tandis qu'un PDLLA est intrinsèquement amorphe. Dans le cas du PLLA et du PDLA, on note une température de transition vitreuse (T_g) entre 50°C et 70°C. Les températures de fusion (T_m) se situent entre 120°C et 180°C, dépendamment des ratios des unités de L, D et DL. Au-dessus, d'un pourcentage de 15% de DL dans le PLLA, le polymère devient amorphe [236]. De manière générale, l'ajout de PDLA dans le PLLA diminue drastiquement le taux de cristallinité. D'autre part, on dénote une grande sensibilité des propriétés physico-chimiques pour des faibles taux de PDLA dans le PLLA. Par exemple, Saha *et al* [182] ont montré que des PLAs possédant des taux de 0,2% et de 1,2% d'isomère D pouvaient avoir des comportements très différents face à l'hydrolyse. Pour des PLAs stéréocomplexés, la température de fusion est d'environ 220-230°C et peut avoir un taux de cristallinité de 70% [299,386,387]. Les résultats dépendent de beaucoup d'autres conditions comme l'histoire thermique, les conditions de polymérisation ou la forme des échantillons.

La transition vitreuse a également été étudiée de manière exhaustive et notamment en regard de sa dépendance à la cristallisation. En effet, on peut noter un déplacement de la T_g vers les hautes températures lorsque la température de cristallisation augmente [388]. Ces observations ont conduit à un modèle à trois phases possédant une phase cristalline, une phase amorphe dite rigide et une phase amorphe mobile. La phase amorphe mobile se

trouve à l'interface entre les deux autres phases et peut participer à la cristallisation du PLA [313].

La TM-DSC est une technique apparue dans les années 90s qui permet une analyse thermique beaucoup plus fine des matériaux que la DSC classique. En effet, malgré que la DSC classique est très connue et simple d'utilisation, dans certains cas, elle ne permet pas de dissocier des transitions thermodynamiques se chevauchant dans un même intervalle de température. Un exemple bien connu et déjà étudié dans cette thèse au chapitre V est le chevauchement entre la transition vitreuse et la température de relaxation des chaînes de polymère. La TM-DSC permet donc d'apporter des solutions dans la compréhension de thermogrammes complexes en DSC classique.

Le signal d'entrée en TM-DSC est composé d'une partie linéaire, déjà présente en DSC, et une partie modulée en température (Equation 26) impliquant une dépendance au temps de la variation en température.

$$T(t) = T_0 + \beta_0 \cdot t + f(T, t) \quad (\text{Eq. 26})$$

Où β_0 est la vitesse de chauffe en K/min et $f(T, t)$ la fonction de modulation, dans le cas de TM-DSC : $f(T, t) = A \cdot \sin(\omega t)$ avec A l'amplitude de la modulation en K et ω la pulsation en Hz et T_0 la température initiale.

Le signal de sortie est donc un flux de chaleur dépendant du temps. Une déconvolution par transformée de Fourier, généralement automatisée par les logiciels de DSC, dissocie le flux de chaleur total, égal au flux de chaleur résultant en DSC classique dans des conditions similaires, du flux de chaleur réversible. Le flux de chaleur non-réversible est calculé en soustrayant le flux de chaleur total et le flux de chaleur réversible. Le choix des paramètres d'entrée par l'utilisateur, à savoir la vitesse de chauffe, l'amplitude de la modulation et la pulsation, permet, lorsqu'ils sont bien choisis, de dissocier les phénomènes thermodynamiques réversibles et irréversibles [389].

La TOPEM[®]-DSC est une méthode avancée de TM-DSC, disponible depuis 2006. Il existe environ une trentaine d'articles publiés dans des journaux avec comité de lecture sur ce sujet soit du point de vue de la technique soit de son utilisation. Cette technique a été développée et brevetée par Mettler Toledo dans le but de s'affranchir du choix de paramètres. En effet, la recherche du bon jeu de paramètres peut être couteuse en termes de temps et de matériaux. Dans cette nouvelle technique, la fonction de modulation périodique est remplacée par une modulation stochastique en pulsation dont l'intervalle de pulsation est défini par l'utilisateur. Ainsi, à partir d'une mesure en TOPEM, il est possible de trouver les flux de chaleurs réversibles et non-réversibles par une transformée de Laplace, procédure détaillée dans la littérature [390]. Cependant, comme le thermogramme est multi-fréquentiel, le calcul n'est pas direct et doit être estimé par l'utilisateur.

Dans ce contexte, ce travail a pour but de montrer l'apport du TOPEM[®]-DSC dans l'analyse thermique des nanofibres de PLA, de voir le potentiel du TOPEM pour étudier la dégradation des nanofibres et de définir une méthode de détermination des bons paramètres lors de l'évaluation TOPEM.

2. Matériels et méthodes

2.1 Fabrication des nanofibres de PLA

Les deux PLAs utilisées dans cette étude proviennent de Hycail Finland (Torku, Finland) (PLA1) et Biomer (Biomer L9000, Krailling, Allemagne) (PLA2) dont les caractéristiques moléculaires sont détaillées dans le chapitre III. Le troisième matériau est un PLLA dont la synthèse et les propriétés sont précisées au chapitre V. On peut rappeler que le PLA1, le PLA2 et le PLLA sont constitués respectivement de 90 %, de 96 % et de 100 % de LLA.

La fabrication des nanofibres a été optimisée suivant les méthodes décrites dans le chapitre IV. Brièvement, les polymères ont été solubilisés dans du chloroforme aux concentrations de 7 % pour le PLA1 et PLA2 et 14 % pour le PLLA puis filés avec une aiguille de 22G (0,41 mm de diamètre intérieur), un débit de 10 mL/h, une pression d'air de 5 MPa et une hauteur entre la seringue et le collecteur de 300 mm.

2.2 Mesures en DSC et TOPEM[®]-DSC

Les mesures ont été effectuées avec une DSC 823e (Mettler Toledo Canada, Mississauga, Ont., Canada), calibrées à l'indium, et analysées avec le logiciel STARe. Les échantillons étudiés sont le PLA1 et PLA2 tel que reçu par le fournisseur et sous forme de nanofibres filé par jet d'air. La masse des échantillons était de $6,5 \pm 0,2$ mg. Les mesures de DSC classique ont été effectuées en 3 étapes afin de visualiser toutes les transitions. Tout d'abord, les échantillons ont été chauffés à 2 K/min de 25 °C à 200 °C, puis, refroidit à 50 K/min de 200°C à 25°C et rechauffé à 20 K/min de 25 °C à 200 °C.

Les mesures en TOPEM[®]-DSC ont été réalisées sur les mêmes échantillons ainsi que sur des nanofibres de PLLA. Le tableau 9 décrit les conditions de mesures pour les trois polymères.

Tableau 9 : Conditions de mesures en TOPEM[®]-DSC

Polymère	segment	Intervalle de température	Vitesse de chauffe	Amplitude	Intervalle de pulsation
PLA1	1	25 °C - 120 °C	0,5 K/min	0,16 K	15 s - 30 s
	2	120 °C - 180 °C	1 K/min	0,32 K	30 s - 120 s
PLA2	1	25 °C - 140 °C	0,5 K/min	0,16 K	15 s - 30 s
	2	120 °C - 200 °C	1 K/min	0,32 K	30 s - 120 s
PLLA	1	25 °C - 140 °C	0,5 K/min	0,16 K	15 s - 30 s
	2	120 °C - 220 °C	1 K/min	0,32 K	30 s - 120 s

Ces paramètres ont été adaptés à partir de la littérature [391] et d'essais reproduits au préalable sur le PET [392]. D'une part, la période ou la pulsation doivent être supérieures au temps caractéristique de transition, temps pour laquelle la transition s'effectue. D'autre part, chaque transition doit être balayée au minimum par 4 pulsations [391].

2.3 Stratégie d'optimisation des mesures en TOPEM[®]-DSC

Chaque résultat d'évaluation en TOPEM est défini par une largeur de fenêtre de calcul (W), un décalage de la fenêtre (S), une largeur de fenêtre de lissage (L), un nombre de paramètres liés à la réponse de l'échantillon (N_1) et un nombre de paramètres liés à la

réponse de l'instrument (N_2). Les calculs sont opérés par le logiciel et certains critères ont été mis en place et justifiés dans la littérature.

- Les nombres de paramètres liés aux réponses de l'échantillon et de l'instrument correspondent aux nombres de degrés de liberté servant à la reconstruction du signal par régression au moindre carrée [390]. On définit que $N_1 = N_2 = 60$.
- En ce qui concerne les paramètres liés à la fenêtre de traitement du signal (Figure 71), on considère que $S = \frac{W}{10}$ [392].

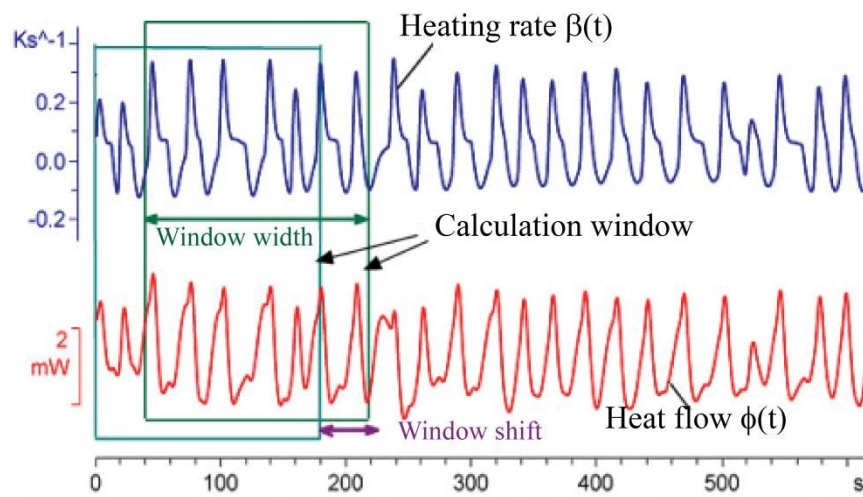


Figure 71. Vitesse de chauffe (bleu) et flux de chaleur (rouge). La largeur de fenêtre est de 180 s et le décalage est de 40 s.

- La fenêtre de lissage doit être plus courte que la fenêtre de calcul [393]. Ces paramètres sont, par défaut, de 120 s pour la fenêtre de calcul et de 90 s pour la fenêtre de lissage. On considère donc que $L = \frac{4}{3}W$.
- Une loi générale présente dans la littérature [393] est telle que : $\frac{W}{0,1(N_1+N_2)} > 10$. Ceci implique que $W > 120$ s.

En considérant tous ces critères, le paramètre W est le seul degré de liberté du système et doit être supérieur à 120 s. La Figure 72 montre le système calculé par le logiciel de

TOPEM[®]-DSC. L'étude portera donc sur le calcul de $\varepsilon(t)$ en fonction de W. La valeur de W retenue sera telle que $\varepsilon(t)$ est minimum [394,395].

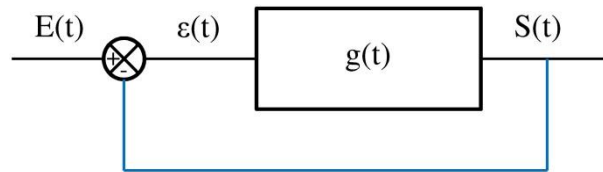


Figure 72. Fonction de transfert du calcul de l'évaluation TOPEM. E(t) est le flux de chaleur mesuré par la DSC. S(t) est le flux de chaleur total calculé par l'évaluation TOPEM. La fonction g(t) correspond au calcul fait par le logiciel dépendant de W. $\varepsilon(t) = S(t) - E(t)$

2.4 Calculs des propriétés thermiques en DSC et TOPEM[®]-DSC

La température de transition vitreuse est calculée par la méthode des tangentes définie par le logiciel tandis que le pourcentage de cristallinité est calculé par l'équation 24.

$$\chi(\%) = \frac{H_m - H_c}{H_{m,100\%}} \quad (\text{Eq. 27})$$

Où H_m est l'enthalpie de fusion (en J/g) calculée par l'intégration des pics de fusion endothermique, H_c est l'enthalpie de cristallisation (en J/g) calculée par l'intégration des pics de cristallisation exothermique et $H_{m,100\%} = 93,6 \text{ J/g}$ [396].

3. Résultats et discussion

3.1 Résultats en DSC

La Figure 73 présente les thermogrammes enregistrés par DSC des PLA1 et PLA2 sous forme de granulés (brut) et de nanofibres. Ces thermogrammes montrent plusieurs transitions similaires à ce qu'on peut trouver dans la littérature [397] :

- Une transition vitreuse (T_g) qui caractérise la phase amorphe du polymère et le passage d'un état solide vitreux à un état solide visqueux, facilement détectable sur le deuxième cycle de chauffe.
- Une relaxation, dépendante du vieillissement physique et non réversible, confondue avec la transition vitreuse. Cette relaxation est surtout visible sur les granulés de PLA1 mais si le polymère se dégrade, l'enthalpie de relaxation augmentera (chapitre V).
- Une ou plusieurs cristallisations qui montrent une réorganisation du polymère dont le début du processus survient juste après la T_g .
- Une ou plusieurs fusions qui caractérisent les phases cristallines et le passage d'un état solide à un état liquide. On peut voir sur le thermogramme du PLA2-NF une recristallisation proche de la fusion autour de 150 °C.

Tout d'abord, le PLA1 possède des températures de fusion plus faible de 20 °C que le PLA2 quelle que soit la forme. Ceci s'explique par des pourcentages de DLA différents entre le PLA1 et le PLA2 [398]. On observe également que le filage des nanofibres induit un pic de recristallisation plus élevé montrant une grande proportion de phases amorphes mobiles par rapport aux phases amorphes rigides ; ceci a été expliqué dans le chapitre V. Cependant, les thermogrammes des nanofibres montrent plusieurs pics de cristallisation (Figure 73). Ces phénomènes, ainsi que les multiples pic de fusion, ont souvent été étudiés [391,399,400].

- Il peut exister initialement deux populations de cristaux différents ce qui produit un double pic de fusion.
- La cristallisation des phases amorphes mobiles amène à une nouvelle population cristalline, différente de celle qui était présente initialement.
- Une partie des cristaux n'ont pas fini s'organiser de manière stable ce qui crée une nouvelle population cristalline. Cette nouvelle population est un défaut dans la maille cristalline et termine son processus de cristallisation pendant la fusion.

- Un seul type de cristal est présent dans le polymère mais il est représenté par plusieurs tailles de cristallites.
- Ces différents types de cristaux sont issus de la stéréochimie du polymère.

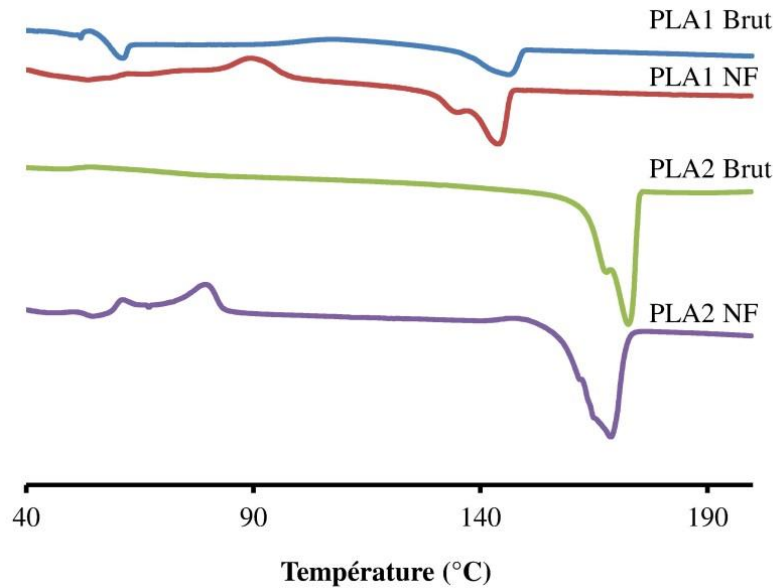


Figure 73. Premier cycle de chauffe des PLA1 et PLA2 sous forme de granulés (brut) et nanofibres

Le recouvrement de plusieurs transitions ainsi que les phénomènes de transitions multiples ne peuvent être expliqués uniquement par des essais de DSC. Dans cet objectif, le TOPEM[®]-DSC peut donc être une alternative à la DSC.

3.2 Optimisation des mesures de TOPEM[®]-DSC

La Figure 74 montre l'influence de la valeur de W sur les flux de chaleur réversible et non-réversible des nanofibres de PLA2. Ces thermogrammes démontrent que les valeurs de W jouent un rôle important sur les valeurs d'enthalpie de fusion mais aussi sur le découplage entre la fusion, phénomène réversible, et la recristallisation phénomène irréversible. Il est donc nécessaire de représenter $\varepsilon(t)$ et d'intégrer cette courbe sur la largeur du domaine de fusion.

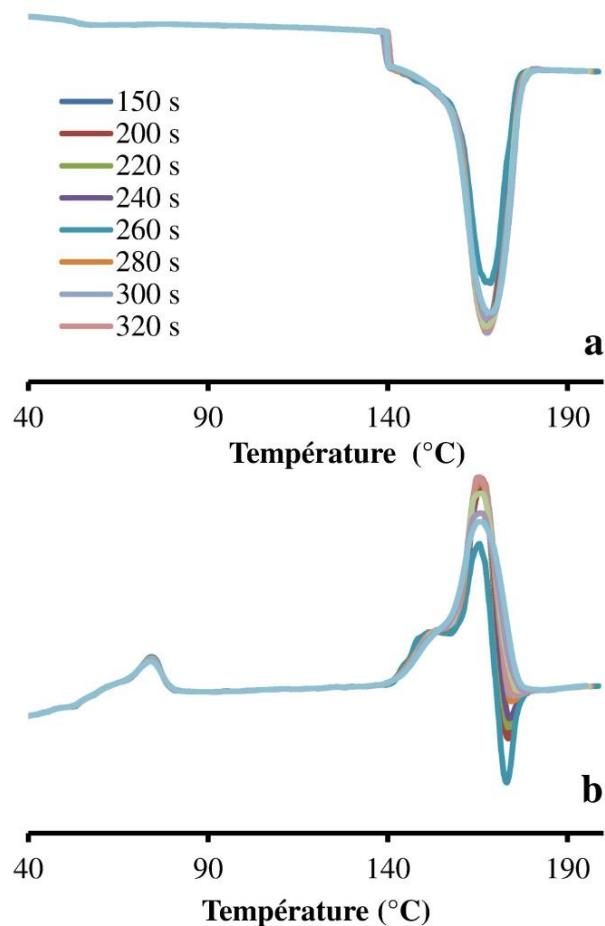


Figure 74. Thermogrammes de TOPEM[®]-DSC représentant les flux de chaleurs réversible (a) et non-réversible (b) en fonction de W

La Figure 75a montre un exemple de courbes $E(t)$, $S(t)$ et $\varepsilon(t)$ et la Figure 75b, les résultats des sommes des amplitudes des pics de fusion sur la courbe $\varepsilon(t)$ pour chaque valeur de W calculée sur le même intervalle. La Figure 75b Les valeurs minimales de W sont 180 s pour le PLA1, 320 s pour le PLA2 et 230 s pour le PLLA.

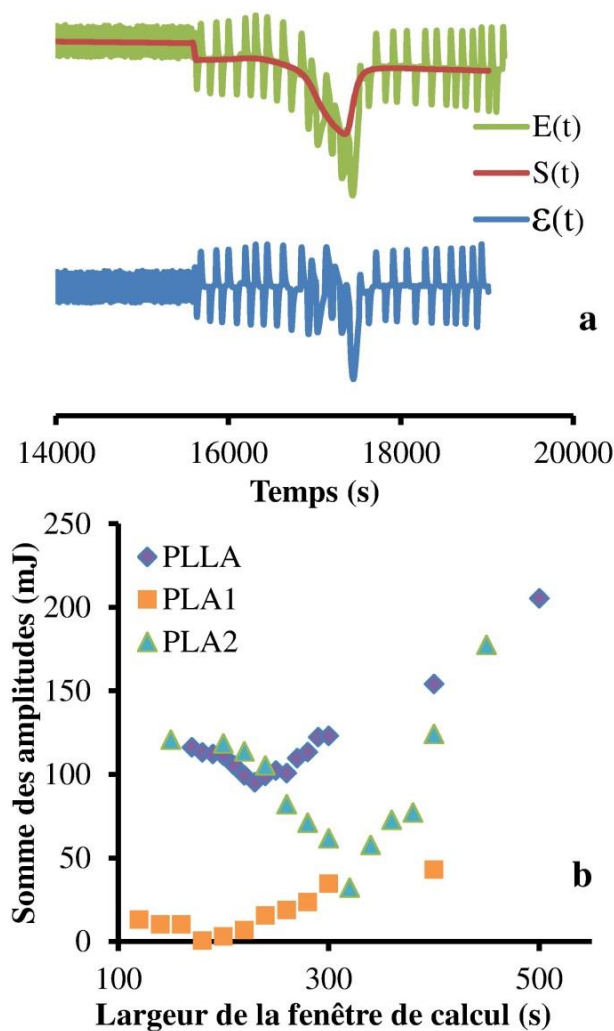


Figure 75. $E(t)$, $S(t)$ et $\epsilon(t)$ pour les nanofibres de PLA2 avec $W = 320$ s (a). Somme des amplitudes calculées à partir de $\epsilon(t)$ en fonction de la largeur de la fenêtre de calcul pour les nanofibres de PLA1, PLA2 et PLLA (b).

3.3 Analyse des courbes de TOPEM[®]-DSC des nanofibres de PLA

La Figure 76 présente les flux de chaleur réversible et non-réversible lors de la chauffe des nanofibres de PLA1, PLA2 et PLLA. On peut voir que les phénomènes réversibles, à savoir la transition vitreuse et la fusion, et les phénomènes non-réversibles, c'est-à-dire la relaxation, la cristallisation froide et la recristallisation, sont bien découplés. Ces observations viennent corroborer la justesse de la méthode testée qui pourra, par la suite,

être utilisée pour visualiser l'évolution des phénomènes liés à la microstructure des nanofibres pendant la dégradation.

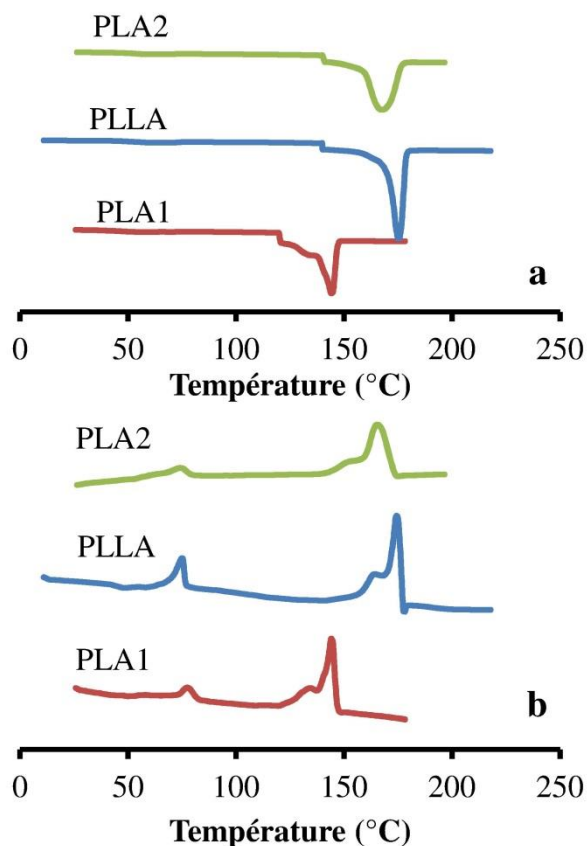


Figure 76. Thermogrammes réversibles (a) et non-réversibles (b) en TOPEM[®]-DSC des nanofibres de PLA1, PLA2 et PLLA

Le TOPEM[®]-DSC permet également la visualisation des phénomènes de recristallisation et notamment leur implication dans l'explication des pics multiples de fusion observés en DSC.

Le tableau 10 compare les résultats de DSC et de TOPEM[®]-DSC. Ce tableau montre que la température de transition vitreuse est similaire entre les mesures en DSC et TOPEM[®]-DSC. Néanmoins, les propriétés liées à la cristallinité présentent des différences notables. Ces différences sont principalement dues aux conditions de chauffage des échantillons.

Tableau 10 : Propriétés thermiques des nanofibres de PLA1, PLA2 et PLLA mesurées en DSC et TOPEM[®]-DSC

	DSC*				TOPEM [®] -DSC*				
	T _g (°C) (2 ^{ème} cycle)	H _c (J/g)	H _m (J/g)	X _c (%)	T _g (°C)	H _c (J/g)	H _{rc} (J/g)	H _m (J/g)	X _c (%)
PLA1	48,1	20,9	22,6	1,8	47,8	16,6	36,4	58,7	6,1
PLA2	52,0	22,0	42,5	21,9	52,4	16,2	37,5	85,2	33,7
PLLA	56,7	23,72	52,1	30,3	54,2	22,5	38,5	85,9	26,6

*H_m est l'enthalpie de fusion, H_c est l'enthalpie de cristallisation, H_{rc} est l'enthalpie de recristallisation, X_c est le taux de cristallinité et T_g est la température de transition vitreuse.

4. Conclusion et perspectives

Dans cette annexe, une méthode est développée afin de découpler les effets thermiques réversibles et non-réversibles lors de la chauffe du PLA avec une DSC à modulation stochastique (TOPEM[®]-DSC). Elle pourrait être une technique prometteuse pour l'analyse de la dégradation des polymères, particulièrement sur le suivi des phases cristallines en fonction de la dégradation. De plus, des analyses additionnelles, notamment sur l'étude de la capacité thermique [401–403], permettront d'en savoir plus sur les phénomènes liés à la transition vitreuse observés dans le chapitre V.

Annexe III. Analyse de la cristallinité des nanofibres de PLA par diffraction des rayons X

1. Introduction

Selon les conditions de fabrication et de son évolution, le PLA est un matériau polymorphe s'organisant selon trois phases principales (α , β , γ et stéréocomplexes) [404]. Ces structures peuvent être détectées par diffraction des rayons X (XRD) [405].

La conformation du PLA la plus fréquente, la plus stable thermodynamiquement ($T_m = 180^\circ\text{C}$) et la première qui fut découverte, est l'hélice α [406]. La forme α du PLA est caractérisée par une hélice tournée vers la gauche dans une maille pseudo-orthorhombique dont le motif est composé de deux chaînes antiparallèles. Chaque hélice adopte une configuration 10_3 , c'est-à-dire une rotation d'un angle de 108° ($3 \times 360^\circ / 10$) entre chaque monomère successif dans une hélice de 10 unités. Les paramètres de mailles sont $a = 10,66 \text{ \AA}$, $b = 6,16 \text{ \AA}$ et $c = 28,88 \text{ \AA}$. Cette configuration stable favorise la formation de liaison de van der Waals intermoléculaire entre les groupements méthyles des deux chaînes, ces groupements étant orientés vers l'extérieur de l'hélice [407]. Une autre phase α , appelée α' , a été découverte lors d'une cristallisation du PLA au-dessous de 90°C . Cette phase hexagonale, considérée comme une phase α qui n'a pas fini de cristalliser, est issue de la phase α primaire mais se trouve être moins stable.

Les phases cristallines sous forme de feuillet β ont été découvertes dans les structures fibreuses. Elles apparaissent lors de l'extrusion des fils de PLA à haute température ou à haute vitesse. Cette structure s'organise adoptant un motif de 6 chaînes formant des hélices de configuration 3_1 dans une maille pseudo-orthorhombique de paramètres $a = 10,31 \text{ \AA}$, $b = 18,21 \text{ \AA}$, and $c = 9,0 \text{ \AA}$. Des recherches ont montré que cette nouvelle phase était issue de la compression des phases α lors de la fabrication des fibres. Plus tard, d'autres recherches ont mené à une autre phase β , cette fois-ci trigonale [408]. Cette forme est dite frustrée car formée pendant un chauffage rapide. Une autre configuration, appelée γ , peut être formée à

partir d'une cristallisation épitaxiale, c'est-à-dire orientée. Ces recherches ont abouti à une structure orthorhombique sous forme d'hélice 3_1 de paramètre de maille de $a = 9,95 \text{ \AA}$, $b = 6,25 \text{ \AA}$, and $c = 8,8 \text{ \AA}$ [409].

La formation de PLA stéréocomplexé induit de nouvelles formes cristallines plus stables. Ce type de PLA s'organise sous la forme d'une hélice 3_1 de maille triclinique de paramètres $a = b = 9,15 \text{ \AA}$, $c = 8,7 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 109,2^\circ$ et $\gamma = 109,8^\circ$. Des recherches ont montré que cette nouvelle forme favorisait la création de liens hydrogène entre le groupement méthyle et le groupement carbonyle de la chaîne adjacente conduisant ainsi une liaison plus forte et une augmentation significative de la température de fusion [201].

La diffraction des rayons X (XRD) est donc une méthode de caractérisation adéquate pour contrôler l'évolution des phases cristallines durant la dégradation.

2. Matériels et méthodes

Les échantillons et les essais de DSC utilisés dans cette étude ont été détaillés dans l'annexe II.

Les données issues de la XRD ont été collectées avec diffractomètre Siemens/Brucker utilisant une source monochromatique basée sur la radiation du cuivre ($K\alpha = 1.5418 \text{ nm}$). La tension et l'intensité de courant de la source étaient respectivement de 40 kV et de 40 mA. Le montage est équipé d'un générateur Kristalloflex 760, d'un goniomètre Fixed-Chi 3-circle, d'un détecteur Hi-Star et du logiciel GADDs. Le détecteur est muni d'un collimateur de 0,8 mm de diamètre et les données ont été acquises avec des valeurs de 2θ entre 0° et 30° pendant 300 secondes. Chaque échantillon a été placé dans un capillaire tubulaire en verre avec une épaisseur de paroi de $10 \mu\text{m}$ et un diamètre interne de 1 mm (Charles Supper Company, Natick, MA, United States) et installé dans une platine chauffante contrôlée en température (HCS400-STC200, Instec, Boulder, Colorado, United States) montée entre la source et le détecteur. Les diffractogrammes ont été acquis pour tous les échantillons pendant un cycle de chauffe et de refroidissement, de 30°C à 160°C

pour le PLA1 et de 30°C à 185°C pour le PLA2. Chaque diffractogramme est soustrait à un diffractogramme de référence du verre seul.

3. Résultats et discussion

La Figure 77 montre les diffractogrammes des nanofibres de PLA1 chauffés entre 70 °C et 120 °C et PLA2 chauffés entre 70 °C et 150 °C. La présence des pics des directions (200/110), (203), (210) et (010) [410] représente la phase α dans les deux PLAs. Ces courbes montrent également que la cristallisation du PLA s'effectue à des températures supérieures à 70 °C et confirment les résultats de DSC. Néanmoins, les cinétiques d'augmentation des pics de cristallisation en phase sont clairement différentes pour les deux PLAs. Le PLA1 a eu une cristallisation qui se déroule sur tout l'intervalle de température entre la transition vitreuse et le début de la fusion tandis que le PLA2 démontre une cinétique de cristallisation entre 70 °C et 110 °C. Ces résultats permettent d'apporter un nouvel éclairage sur les thermogrammes de DSC.

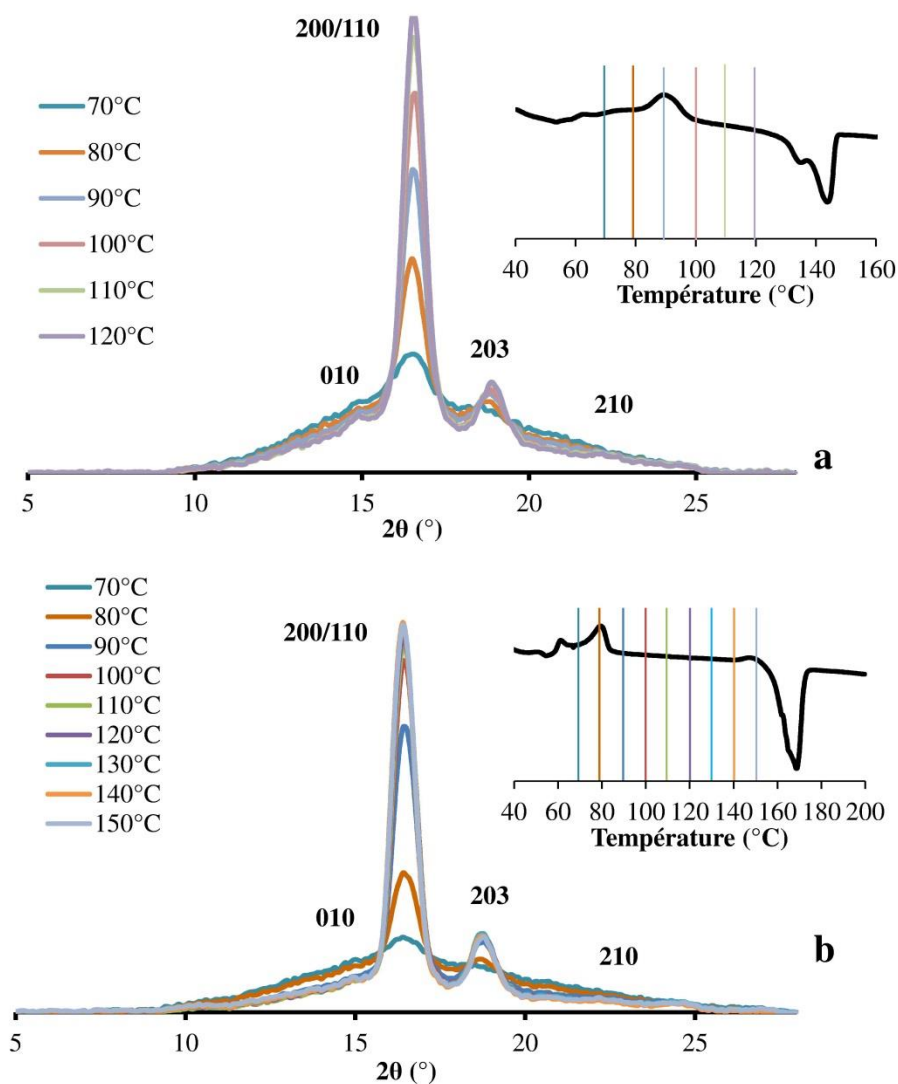


Figure 77. Cristallisation des nanofibres de PLA1 et PLA2. 1a : diffractogramme de XRD et thermogramme de DSC des nanofibres de PLA1, 1b : diffractogramme de XRD et thermogramme de DSC des nanofibres de PLA2

La Figure 78 représente le pic de diffraction suivant la direction (200/110) pendant la fin de la cristallisation et la fusion des nanofibres mais aussi des granulés de PLA1 et PLA2.

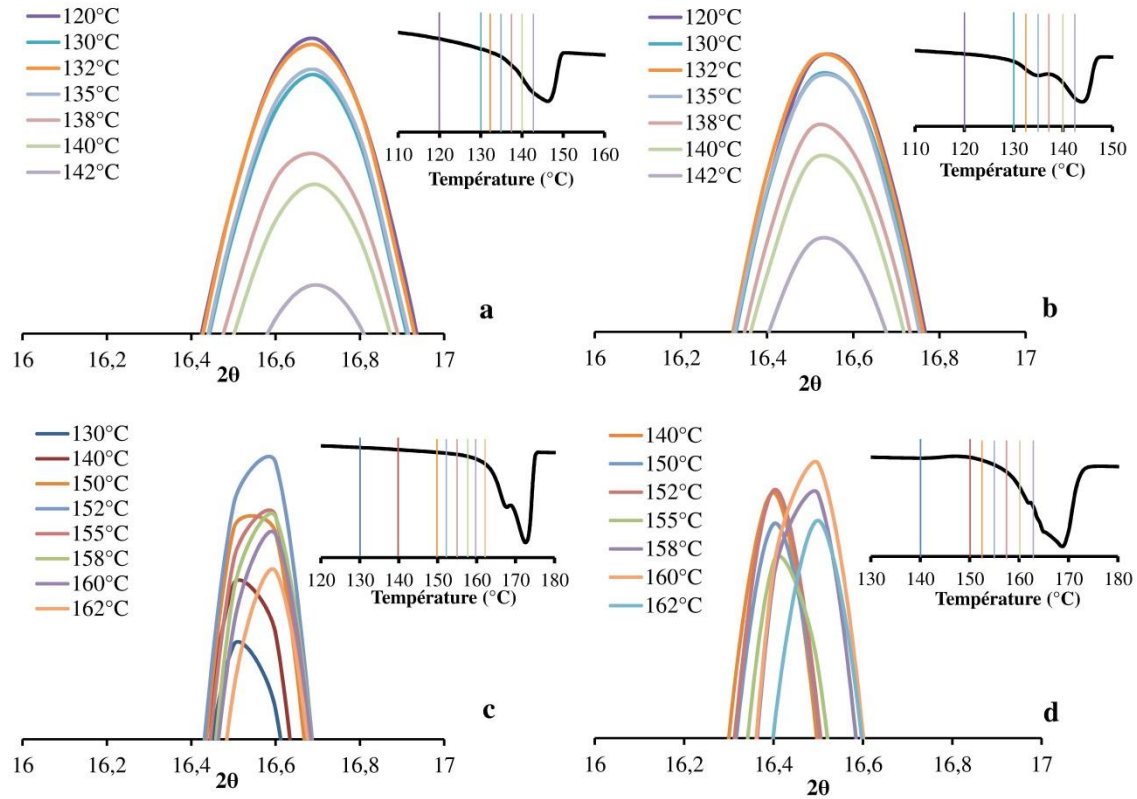


Figure 78. Pic de diffraction X suivant la direction (200/110) et thermogrammes de DSC pour les granulés de PLA1 (a), les nanofibres de PLA1 (b), les granulés de PLA2 (c) et les nanofibres de PLA2 (d).

L'évolution du pic de diffraction (200/110) est très différente dans les quatre systèmes. De manière générale, dans les cas des deux polymères, on peut observer un angle 2θ plus faible pour les nanofibres que pour les granulés. Par exemple, les nanofibres de PLA1 ont un pic (200/110) situé à $16,5^\circ$ tandis que celui des granulés est à $16,7^\circ$. Cette légère différence peut être due à une orientation ou une phase différente. En ce qui concerne le PLA2, les pics sont plus fins que ceux du PLA1. De plus, on peut distinguer un décalage du pic vers les angles les plus grands pendant la cristallisation. Ceci peut montrer un changement de phase α' vers une phase α [410,411]. Ainsi on peut voir que, qualitativement, la phase α' est plus présente que la phase α ce qui implique l'existence d'une mobilité réduite des chaînes des phases cristallines à haute température pouvant provenir de phases amorphes mobiles cristallisées. Finalement, le processus de recristallisation est visible dans les deux

diffractogrammes du PLA1 et celui des nanofibres du PLA2, déterminé par une fluctuation de l'intensité caractérisant des phénomènes exothermiques et endothermiques à la même température de caractérisation.

La littérature [412], ainsi que le chapitre V, indiquent que la cristallinité du PLA augmente en fonction de la dégradation. De plus, le chapitre V montre que ce processus de cristallisation est clairement différent pour les nanofibres. Une étude de XRD en fonction de la dégradation permettrait donc de mieux comprendre ces disparités.

4. Conclusion

La XRD a permis éclaircir le mode de cristallisation ainsi que la nature des phases composant les nanofibres de PLA et permettra d'en savoir plus sur le processus spécifique de la dégradation de ces nanofibres. Néanmoins, afin de confirmer ces résultats, il est nécessaire de coupler la XRD avec une méthode complémentaire de spectroscopie.

Annexe IV. Analyse des nanofibres de PLA par spectroscopie vibrationnelle

1. Introduction

Nous avons vu que, d'une part, la structure du PLA peut être caractérisée par GPC et NMR et que, d'autre part, la cristallinité peut être détectée par DSC et XRD. La spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIR) permet de détecter la vibration de groupements chimiques dont le mouvement induit la variation des dipôles de ces groupements. La plupart des études utilisent la méthode de la réflectance total atténuée (ATR) pour prendre les mesures des spectres sur des matériaux généralement sous forme de films. La spectroscopie FTIR est très sensible aux interactions intermoléculaires et intramoléculaires faibles et permet donc d'obtenir des informations à la fois sur la structure et sur l'influence de cette structure par rapport à la cristallinité du polymère [197,222,413–416].

Beaucoup d'études se sont attardées à décrire l'influence de la tacticité sur la forme du spectre de FTIR. Cette tacticité, impliquant également la cristallinité du polymère, permet une description très complète du spectre FTIR du PLA. Cette description reste néanmoins très globale du point de vue des processus de cristallisation.

Un certain nombre de groupement peuvent être intéressant pour l'étude de la cristallinité. Une analyse plus précise de l'étirement du groupement carbonyle ($C=O$) montre un déplacement du pic vers les nombres d'onde plus bas lors de la chauffe des échantillons de PLA, montrant ainsi un changement dans la structure cristalline, et notamment dans la dissociation des liaisons faibles intermoléculaires et intramoléculaires reliées au $C=O$ [417,418]. De plus, la dérivée seconde du pic de l'étirement du $C=O$ fait apparaître quatre pics sous-jacents pouvant être attribués à quatre conformères gauche-trans (gt, gg, tt et tg). La comparaison entre les échantillons cristallins et amorphes montre que le conformère gt n'est visible que dans les zones cristallines [417,419]. De plus, ce conformère est visible à

une fréquence différente s'il s'agit de cristallisation froide ou de cristallisation durant la fusion. Cette différence peut-être associée au passage des phases α' aux phases α . L'étirement du C-O-C et la flexion du CH ou du CH₃ sont également des bandes d'intérêt pour étudier les mécanismes de cristallisation du PLA surtout en ce qui concerne la phase α . Des études ont également montré que l'on pouvait corrélérer les taux de cristallinité en DSC avec le ratio entre les deux pics de basculement (rocking) du CH₃ [420,421].

La spectroscopie infrarouge permettrait donc d'en savoir plus sur l'évolution des nanofibres au cours de la dégradation et de faire le lien entre informations au niveau moléculaire et caractéristiques liés à la cristallinité du polymère. Il est donc nécessaire de mettre en place une méthode afin d'étudier ces spectres.

2. Matériels et méthodes

Les échantillons et les essais de DSC utilisés dans cette étude ont été détaillés dans l'annexe II.

Des essais de spectroscopie Raman ont été effectués avec un Spectromètre Horiba modèle Labram BX40 (Irvine, CA, USA) équipé d'un laser à 632 nm de longueur d'onde et d'un polariseur. Chaque spectre a été pris avec une rotation du polariseur tous les 10° de 0° à 180° pour vérifier l'influence de l'orientation des échantillons sur le signal spectral.

Les spectres infrarouges ont été obtenus avec un spectromètre Nicolet Magna 850 équipé d'un module de réflectance totale atténuée (ATR) Golden Gate avec un cristal en diamant (Specac Ltd., London, UK). Le module ATR est muni d'une platine de chauffe contrôlée en température avec un intervalle allant de la température ambiante à 200 °C. Les spectres consistent en la moyenne de 128 balayages acquis à une résolution de 4 cm⁻¹ entre 750 cm⁻¹ et 4000 cm⁻¹ pour des températures de 30 °C à 160 °C pour le PLA1 et de 30 °C à 180 °C pour le PLA2, toutes les 180 s, avec le logiciel d'acquisition OMNIC (Thermo Scientific). Les spectres ont ensuite été analysés avec le logiciel Grams AI/V8 (Thermo Scientific). Tout d'abord, une ligne de base a été réalisée entre 1600 cm⁻¹ et 1850 cm⁻¹ pour pouvoir analyser le pic caractéristique de l'élongation du groupement carbonyle. Les spectres ont

308

par la suite été normalisés à partir de la hauteur du pic de carbonyle du spectre à 30 °C et dérivés 2 fois avec un selon l'algorithme décrit par Savitsky-Golay [422] en utilisant un polynôme d'ordre 2 sur un nombre de points compris entre 17 et 21 points dépendant de la largeur à mi-hauteur et de la longueur du pic [422–424]. Les minimums des courbes dérivées secondes des spectres dans la zone d'intérêt permettent de visualiser les fréquences des pics sous-jacents.

3. Résultats et discussion

Le changement de l'angle de polarisation ne permet de mettre en évidence aucune différence sur les spectres Raman (résultats non montrés) ce qui signifie que les mesures de spectroscopie Raman effectuées sur des échantillons de nanofibres ne dépendent pas de leurs orientations. Ces résultats peuvent également s'étendre à la spectroscopie infrarouge car la fenêtre d'analyse est plus grande dans cette technique de caractérisation. De plus, cette tendance confirme que, dans ce cas, la zone de mesure est trop grande par rapport à la taille des fibres et que la superposition des fibres dans l'échantillon ne permet pas de détecter une orientation moléculaire.

La Figure 79 confirme les résultats de la littérature sur les pics d'intérêt lors de la chauffe du PLA à savoir, le pic de l'étirement du C=O (Figure 79a) aux alentours de 1750 cm^{-1} , l'étirement du C-O-C (asymétrique : 1250 cm^{-1} et symétrique : 1080 cm^{-1}), la flexion (entre 1300 cm^{-1} et 1500 cm^{-1}) et le basculement (entre 900 cm^{-1} et 970 cm^{-1}) du CH_3 (Figure 79a). Ces pics sont potentiellement des pistes à étudier afin de mieux comprendre la formation et la dégradation des nanofibres de PLA ainsi que l'influence de la nature du PLA de départ. De plus, ces effets permettraient de découpler les vibrations dues à la phase α par rapport à la phase α' [425]. Les résultats présentés dans cette annexe s'intéressent particulièrement aux pics sous-jacents d'étirement de la liaison C=O (Figure 79a), détectables par les minimums de la dérivée seconde.

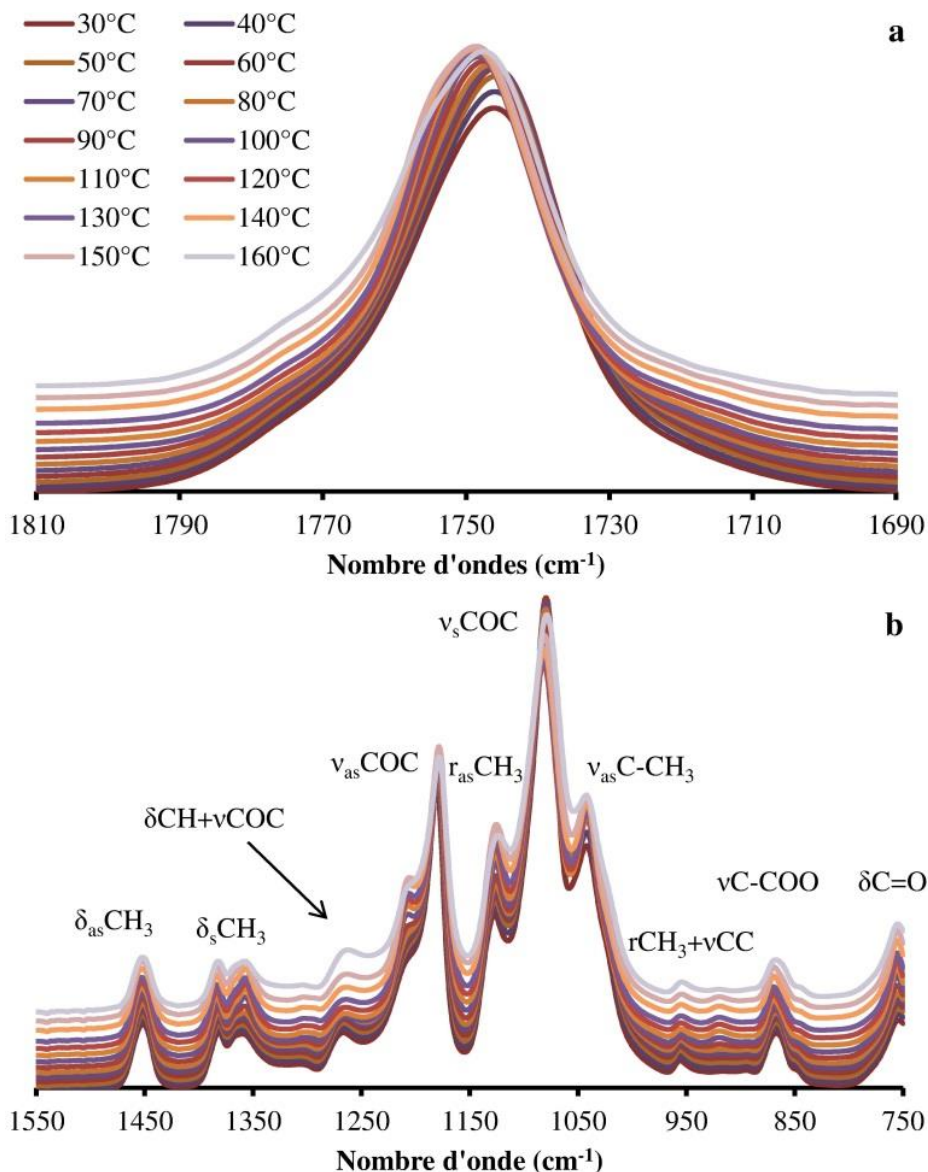


Figure 79. Spectres ATR-FTIR des nanofibres de PLA1 entre 1690cm⁻¹ et 1810cm⁻¹ (a) et 750cm⁻¹ et 1550 cm⁻¹ (b)

La Figure 80 montre la position des pics sous-jacents des spectres infrarouges des nanofibres de PLA1, PLA2 et PLLA pour le pic de carbonyle. Ces courbes démontrent que le comportement de la liaison C=O vis-à-vis de l'augmentation de la température est très différent pour les trois PLAs en ce qui concerne l'intensité du pic principal, mais aussi la position des pics sous-jacents. Tout d'abord, pour le PLA1, l'augmentation du pic est faible

310

en fonction de la température ce qui n'est pas le cas des PLA1 et PLLA. De plus, elle est progressive pour le PLA2 et brutale pour le PLLA. Ensuite, les pics sous-jacents ont déjà été identifiés dans la littérature comme des conformères dépendant du nombre d'onde lié à l'orientation de la molécule dans l'espace [419]. Ces conformères peuvent également être liés à la cristallinité du polymère et la capacité des chaînes à former des liaisons faibles pendant la chauffe du polymère. Néanmoins, on peut observer sur certains spectres l'apparition d'autres pics sous-jacents qui nécessitent d'être identifiés. Par exemple, le spectre du PLLA à 180 °C présente deux pics à des fréquences bien distinctes (1723 cm^{-1} et 1715 cm^{-1}) à la position 4. Une fois de plus, cette caractérisation permettrait d'en savoir un peu plus sur la nature des fibres après filage par jet d'air et après dégradation.

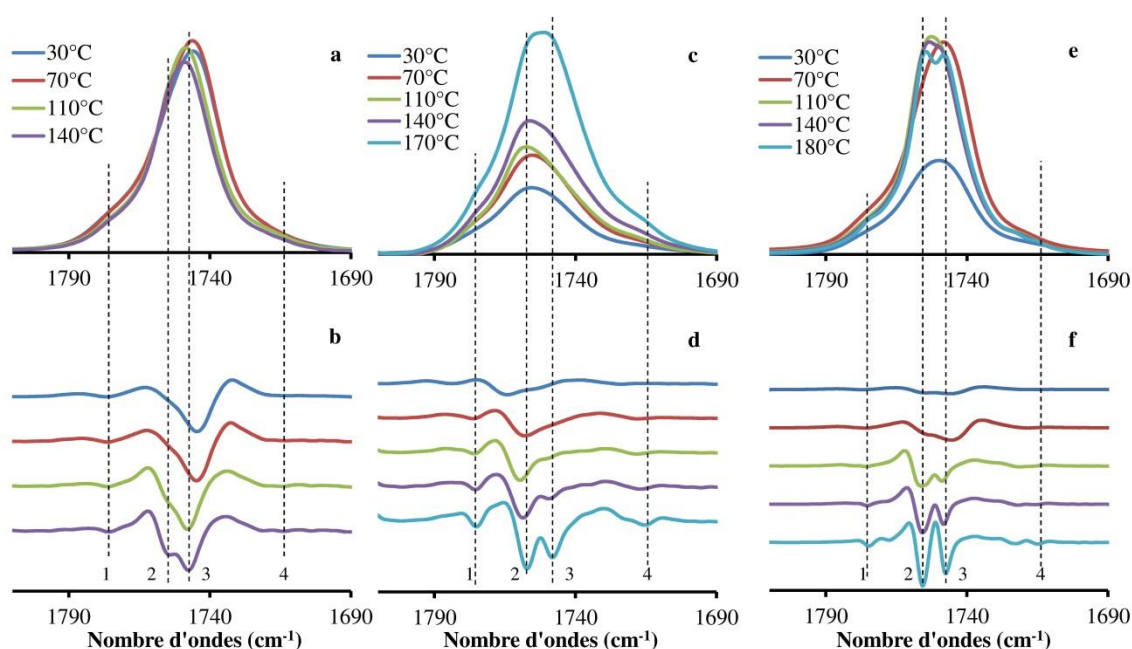


Figure 80. Pics d'étirement du carbonyle et ses dérivées secondes en fonction de la température des nanofibres de PLA1 (a ; b), de PLA2 (c ; d) et de PLLA (e ; f). Pic 1 : conformation gauche-gauche (gg), pic 2 : conformation trans-gauche (tg), pic 3 : conformation gauche-trans (gt), pic 4 : conformation trans-trans (tt)

La Figure 81 montre l'évolution de la position des pics caractérisant les conformations des chaînes de PLAs en fonction de l'augmentation de la température. Ces courbes sont

rapportées aux thermogrammes de DSC pour pouvoir observer l'évolution de chaque conformère vis-à-vis des transitions thermiques du polymère. Tout d'abord, pour les nanofibres de PLLA et de PLA1, on peut observer très clairement que la conformation gt est dépendante de la cristallisation des deux polymères car le pic 3 se déplace vers les hautes énergies sur les mêmes intervalles de température que les pics de cristallisation en DSC. Curieusement, le pic de cristallisation en DSC du PLA2 apparait avec le déplacement du pic représentant la conformation tg. Il est possible que cette différence entre les nanofibres de PLA2 et le PLA1 ou le PLLA implique plusieurs configurations cristallines. D'autant plus que le pic caractéristique de la conformation tg intervient dans les phénomènes de recristallisation du PLA1 pendant sa fusion mises en cause en annexe II. Ces phénomènes, concernant la conformation tg, sont moins évidents chez le PLLA mais également présent. Finalement, les autres pics semblent être liés aux parties amorphes mobiles ou rigides du polymère.

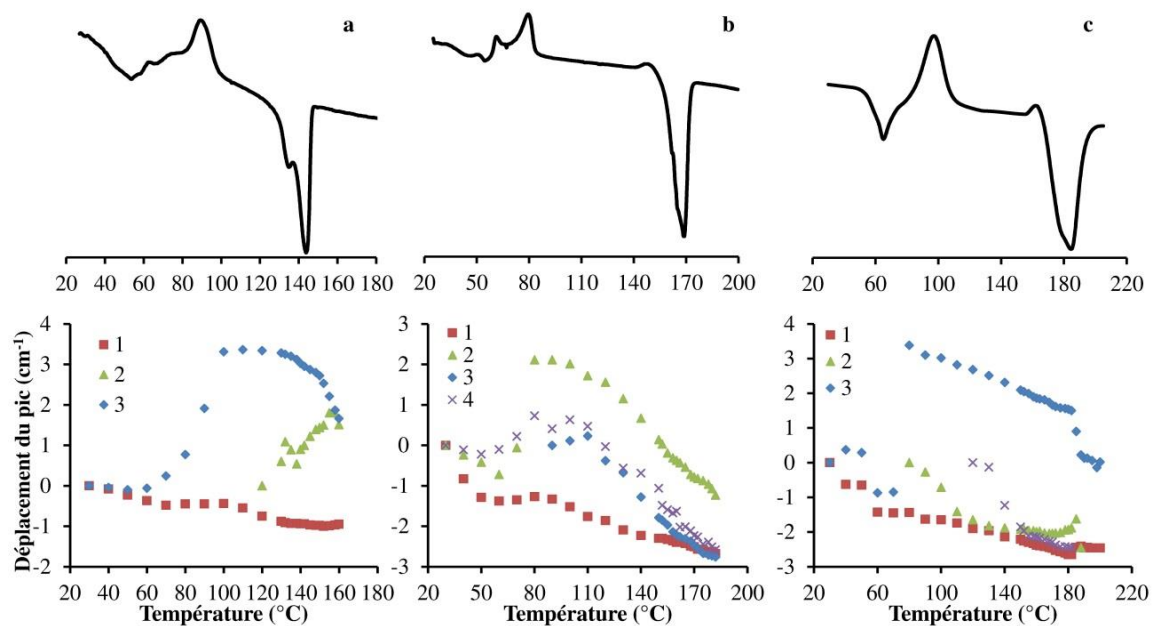


Figure 81. Thermogrammes de DSC et déplacements des pics liés aux conformations gg (1), tg (2), gt (3) et tt (4) des nanofibres de PLA1 (a), PLA2 (b) et PLLA (c) en fonction de la température.

4. Conclusion

La spectroscopie infrarouge a permis de relier des informations d'ordre moléculaire avec des caractéristiques de microstructure. Cette méthode de caractérisation permettrait de connaître la nature des nanofibres à l'échelle moléculaire du point de vue du polymère avant l'étape de filage, mais aussi du suivi de la dégradation des nanofibres en fonction du temps au niveau moléculaire.

Annexe V. Amélioration de l'adhésion des nanofibres sur la surface des prothèses vasculaires

1. Introduction

La conception d'une interface de nanofibres afin de promouvoir la prolifération en monocouche des cellules endothéliales nécessite une adhésion suffisante entre les nanofibres et la surface textile en PET tissée ou tricotée des prothèses vasculaires afin de résister au flux hémodynamique. Afin de résoudre ce problème, un traitement par plasma à pression atmosphérique améliorerait cette adhésion de manière significative tout en étant simple et peu coûteuse. En effet, la technologie des réacteurs plasma à pression atmosphérique permet de s'affranchir d'un environnement sous vide. Le traitement est donc plus rapide, applicable sur de grandes surfaces tout en étant polyvalent et entraînant moins de rupture de la surface que les modifications par attaque chimique. De ce fait, une rupture trop profonde de la surface entraînerait une rupture par fatigue à long terme. Des études précédentes [160], sur la problématique d'adhésion des nanofibres, ont démontré qu'un traitement plasma à l'azote était moins dommageable pour la surface qu'un traitement à l'air et présentait de meilleures propriétés adhésives. Néanmoins, il est clair que la présence d'hydrogène dans la décharge améliorerait la présence d'amine (NH_2) sur la surface [426] et ainsi la formation de liaisons faibles avec le groupement ester du PLA. Il a été démontré sur des films de polymères qu'un traitement au N_2 possédant 5 % de H_2 était une solution optimale pour améliorer les propriétés de surface [426] et notamment l'hydrophilicité du substrat, contribuant fortement aux interactions intermoléculaires avec les nanofibres hydrophobes. Finalement, des essais d'amination de microfibres de PET ont été effectués à basse pression et les résultats ont montrés qu'un temps de traitement plasma opéré à basse pression supérieur à une seconde endommagerait de manière conséquente les fibres de PET [427]. Au vu de ces résultats, il est clair que la surface des prothèses vasculaire textiles en PET doit être modifiée par traitement plasma à pression atmosphérique.

Cette étude porte donc sur l'optimisation l'adhésion des nanofibres sur la surface des prothèses vasculaires textiles en modifiant la surface des prothèses avec un traitement plasma à pression atmosphérique adéquate. Dans ce travail, une attention particulière sera portée sur la modification de surface en fonction du temps de traitement et de la caractérisation de l'adhésion.

2. Matériels et méthodes

2.1 Matériels

Les prothèses vasculaires choisies pour cette étude sont des produits semi-finis juste après fabrication et consistent en deux structures tubulaire sans cosselage, la première, tissée (Dialine II, Bard Cardial, Saint-Etienne, France) et la seconde, tricotée (Wovex, Bard Cardial, Saint-Etienne, France). Ces dispositifs médicaux en PET ont été comparés à des films de PET (Goodfellow, Oakdale, PA, USA).

Les échantillons ont été lavés avec de l'acétone, de l'eau puis de l'éthanol dans un bain à onde 10 min chaque et séchés dans un dessiccateur pendant une nuit.

Les nanofibres ont été fabriquées par filage par jet d'air à partir du PLA choisi dans le chapitre IV dans des conditions optimales, c'est-à-dire une concentration de 7% en solution avec du chloroforme, une aiguille de 22G, un débit de 10 mL/h, une pression d'air de 5 MPa et une distance entre l'aiguille et le substrat de 300 mm.

2.2 Modification de la surface des prothèses et caractérisation

Le film et les échantillons textiles en PET ont été traités avec un réacteur plasma à décharge à barrière diélectrique dont la conception est décrite dans un article précédent [338]. Le réacteur est composé de deux plaques parallèles connectées au générateur de tension. Les échantillons, carrés de 25 mm de côté, sont mis en place avec du ruban adhésif, constituant la barrière diélectrique, sur la plaque reliée à la terre. De l'azote avec 5 % d'hydrogène a été introduit au niveau de l'échantillon avec un débit de 10 L/min en flux laminaire, tout d'abord, pendant 5 min afin de purger l'air dans le réacteur et le remplacer par le mélange

puis, pendant la décharge. La tension a été fixée à 10 kV pour une fréquence de 3 kHz et un espacement entre les électrodes de 1 mm pour obtenir une décharge Townsend homogène sur toute l'électrode [428] ce qui garantit une modification de surface homogène [429]. Les films, les textiles tissés et tricotés ont été traités pendant 15s, 30s et 45s.

Une dérivation chimique en phase gazeuse, décrite dans une publication précédente [430], a ensuite été appliquée sur les échantillons afin de caractériser le taux d'amine primaire (NH_2) sur la surface. Brièvement, il s'agit de greffer une molécule par phase gazeuse à un groupement fonctionnel d'intérêt contenant un élément chimique détectable différent des atomes composant la surface. La réaction a été effectuée à 85 °C pendant 2 h dans un tube fermé dans lequel une poudre de 5-bromosalicylaldehyde a été placée avec l'échantillon. La poudre et l'échantillon sont séparés avec environ 1 cm de billes en verre dans le tube pour éviter leur contact. Après la réaction de dérivation, les échantillons sont placés dans le dessiccateur pendant 24 h.

Les échantillons avant et après dérivation chimique ont été analysés par spectroscopie photoélectronique X (XPS) (PHI 5600-ci, Physical Electronics, Eden Prairie, MN, USA). Une source à rayon X monochromatique en aluminium ($K\alpha = 1486,6 \text{ eV}$) avec une puissance de 400 W a été utilisée pour acquérir les spectres de survol tandis qu'une source en magnésium ($K\alpha = 1253,6 \text{ eV}$) avec une puissance de 150 W a été utilisée pour les spectres à haute résolution sur les pics de C1s. Les spectres ont été acquis à 45 ° par rapport à la surface de l'échantillon. Chaque échantillon a été répliqué 3 fois et chaque mesure a été faite en 3 points différents de l'échantillon ce qui totalise 9 mesures par condition expérimentale. Les résultats ont ensuite été analysés avec le logiciel Multipak (Physical Electronics, Eden Prairie, MN, USA). Les spectres ont été décalés pour que le pic correspondant au signal C1s soit centré à 285 eV pour prendre en compte les effets de charge puis, chaque pic des spectres de survol et de haute résolution a subi un ajustement de courbe avec l'addition de fonctions Gaussienne et Lorentzienne. La concentration en amine primaire est déduite de celle du brome (Br) contenu dans le 5-bromosalicylaldehyde qui a réagi spécifiquement avec ces groupements, par la formule suivante (Equation 28) :

$$[NH_2] = \frac{[Br]}{100 - 9[Br]} \times 100 \quad (\text{Eq. 28})$$

Les échantillons avant et après modification de surface ont été analysés par mouillage puis mesure de l'angle de contact (VCA 2500 XE, AST, Billerica, MA, USA). Cette technique a également été utilisée pour mesure l'angle de contact après modification de surface et entreposage jusqu'à 12 jours. Trois gouttes d'eau distillée de 3 µL ont été déposées et leur angle de contact a été mesuré sur chaque surface.

2.3 Caractérisation du recouvrement de nanofibres sur les prothèses vasculaires

Les nanofibres ont été pulvérisées dans des conditions optimisées (chapitre IV) sur des films de PET fixés sur la platine mobile en translation (VXM, Velmex, Bloomfield, NY, USA). Le filage a été effectué à plusieurs passages (1, 2 ou 3 passages) et vitesses de translation de la platine motorisée (2,5 mm/s, 7,5 mm/s ou 15 mm/s), puis, chaque échantillon a été analysé par microscopie électronique à balayage (SEM) (EVO® 50, Carl Zeiss, Göttingen, Germany). Le microscope est équipé d'un détecteur d'électron secondaire Everhart-Thornley de tension d'accélération de 10 kV. Les images ont été traitées avec le logiciel image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) dans le but de calculer le pourcentage de surface recouverte par les fibres. Il s'agit de séparer la somme des pixels blancs des pixels noirs et d'en faire le rapport. De plus, la masse des échantillons avant et après recouvrement a été mesurée avec une balance de précision ($\pm 1\mu\text{g}$). Tous les échantillons ont été répliqués trois fois.

2.4 Caractérisation de l'adhésion des nanofibres sur la surface des prothèses

Dans le but de mesurer l'adhésion des nanofibres sur les prothèses vasculaires tissée et tricotée, mais aussi sur les films, des essais d'arrachement statique adaptés de la norme ASTM D6195-03 [431], sur les films en PET recouverts de nanofibres, ont été réalisés à l'aide d'un dynamomètre (Model 5944, Instron, Norwood, MA, USA) équipé d'une cellule de force de 5 N. Un ruban adhésif de dimension 175 mm x 25 mm a été placé entre les

pincettes du dynamomètre et collé sur l'échantillon. La surface en contact entre le ruban adhésif et l'échantillon, fixé sur l'appareil, était de 25 mm x 25 mm. Un poids de 1 N a été appliquée sur le ruban adhésif pendant 2 h afin d'homogénéiser le contact entre le ruban adhésif et l'échantillon. La traction du ruban adhésif a ensuite été exécutée à une vitesse de 100 mm/min. Finalement, le ruban adhésif a été observé au microscope optique.

L'adhésion des nanofibres a été caractérisée par des essais dynamiques en chambre de flux (Figure 82). Une chambre de flux à plaques parallèles a été conçue et fabriquée dans le but de simuler un écoulement laminaire pseudo-physiologique dans des artères de petits diamètres sur des échantillons textilee montés sur des plots en PTFE (Figure 94). On définit la force de cisaillement appliquée aux échantillons par l'équation 29.

$$\tau = \frac{6\mu U}{a} \quad (\text{Eq. 29})$$

Où a est la distance entre les plans (en m), U est la vitesse moyenne du fluide (en m/s) et μ la viscosité (Pa.s).

Steinman et al [432] ont rapporté que pour une artère fémorale de 6,5 mm de diamètre, la contrainte de cisaillement maximale est de 20 dyn/cm². Cette valeur a été choisie comme maximum et permet donc de calculer la vitesse du fluide ($U = 1\text{m/s}$) avec $a = 2,5\text{ mm}$. Le calcul de la longueur L et de la largeur b sont basés sur deux critères. Le premier est que le premier échantillon doit être soumis à un cisaillement constant sur toute sa surface. Le profil de vitesse doit donc être constant dans les limites de l'échantillon.

Le deuxième critère est en lien avec le premier : l'épaisseur des couches limites doit être inférieure aux limites du premier échantillon. Dans notre cas, ces deux critères se traduisent par les deux systèmes d'équations (Équation 30 et Équation 31) suivantes [154] :

$$\begin{cases} L > 0,04 \times a \times Re_a \\ Re_a = \frac{\rho U a}{\mu} \end{cases} \quad (\text{Eq. 30})$$

$$\begin{cases} b > \frac{5L}{\sqrt{Re_L}} \\ Re_L = \frac{\rho U L}{\mu} \end{cases} \quad (\text{Eq. 31})$$

Le diamètre des plots est imposé et égal à 8,5 mm. Re_a et Re_L sont les nombres de Reynolds suivant les directions z et x . Les valeurs de densité ρ et de viscosité μ sont respectivement 1017 kg/m^3 et $8,4 \times 10^{-4} \text{ Pa.s}$ pour le M199 ou 10^{-5} Pa.s pour l'eau. De plus, les plots sont séparés par une distance de 5 mm. La longueur L a été choisie égale à 360 mm et la largeur b à 20 mm.

La nature dynamique du flux doit également être respectée. Le paramètre choisi est le nombre de Womersley (Équation 32), nombre sans dimension qui traduit la turbulence d'un fluide visqueux sous écoulement pulsé.

$$W_0 = \frac{a}{2} \sqrt{\frac{\rho \omega}{\mu}} \quad (\text{Eq. 32})$$

Avec ω la fréquence en Hz. $\rho = 1080 \text{ kg/m}^3$ et $\mu = 0,0035 \text{ Pa.s}$ (valeur pour le sang), valeurs typiques pour un battement cardiaque de 70 bpm, $W_0 = 4,51$ donc $\omega = 1,7 \text{ Hz}$.

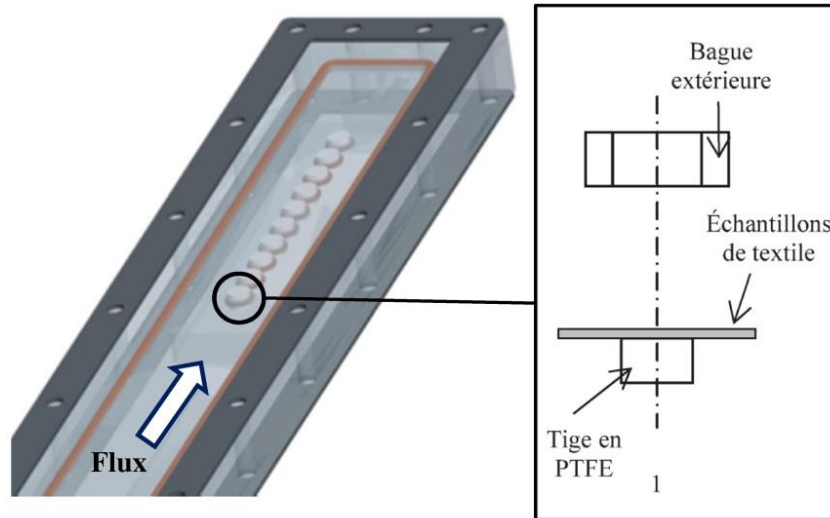


Figure 82. Chambre de flux et porte échantillon

La chambre de flux a été connectée à une pompe péristaltique (série L/S[®], Cole Parmer, Montréal, QC, Canada) et un bécser servant de réservoir. Des échantillons textiles tissés ayant subi des traitements plasmas (15 s, 30 s et 45 s) puis recouverts de nanofibres ont été fixés à l'aide de plots et placés dans la chambre de flux. Un débit de 2,5 L/min, correspondant à une force de cisaillement de 20 dyn/cm², a été appliqué pendant 1 h sur les échantillons. Les échantillons ont ensuite été visualisés par SEM.

3. Résultats

3.1 Modification de la surface des prothèses

Les spectres XPS (résultats non présentés) montrent l'apparition d'un pic d'azote après traitement par plasma dans la structure du PET normalement constitué de carbone, d'oxygène et d'hydrogène ce qui signifie que la surface a bien été modifiée. Les spectres de haute résolution du carbone permettent d'identifier les groupements correspondant spécifiquement au carbone. Le pic à 285,0 eV est associé aux liaisons C-C et C-H tandis que le pic à 286,7 eV correspond aux liaisons C-O et C-N et le pic à 288,8 eV appartient aux groupements ester. On peut également observer un épaulement autour de 300 eV appelé « π - π^* shake-up bands » caractéristique du cycle aromatique du PET. Ces spectres

indiquent une baisse drastique du pic π - π^* mettant en évidence une coupure du cycle aromatique [427]. Cependant, aucune autre tendance n'est clairement visible dans l'analyse de ces pics. On s'attendrait néanmoins à une brisure des liaisons ester au profit de la formation de liaison CH ou amine ce qui signifie soit que le traitement n'est pas assez long ou puissant pour obtenir la coupure de cette liaison ou, au contraire, la brisure de ces liaisons amène à l'apparition des chaînes intactes sous-jacentes.

Les spectres de survol et de haute résolution sans dérivation chimique n'apportent pas d'informations quant à la formation de groupements amine. En effet, ce sont les amines primaires qui sont recherchées pour améliorer l'adhésion des nanofibres. La Figure 83 montre la concentration d'amine primaire de NH_2 sur la surface, la sélectivité NH_2/N du traitement et la fonctionnalisation de la surface en NH_2 (NH_2/C).

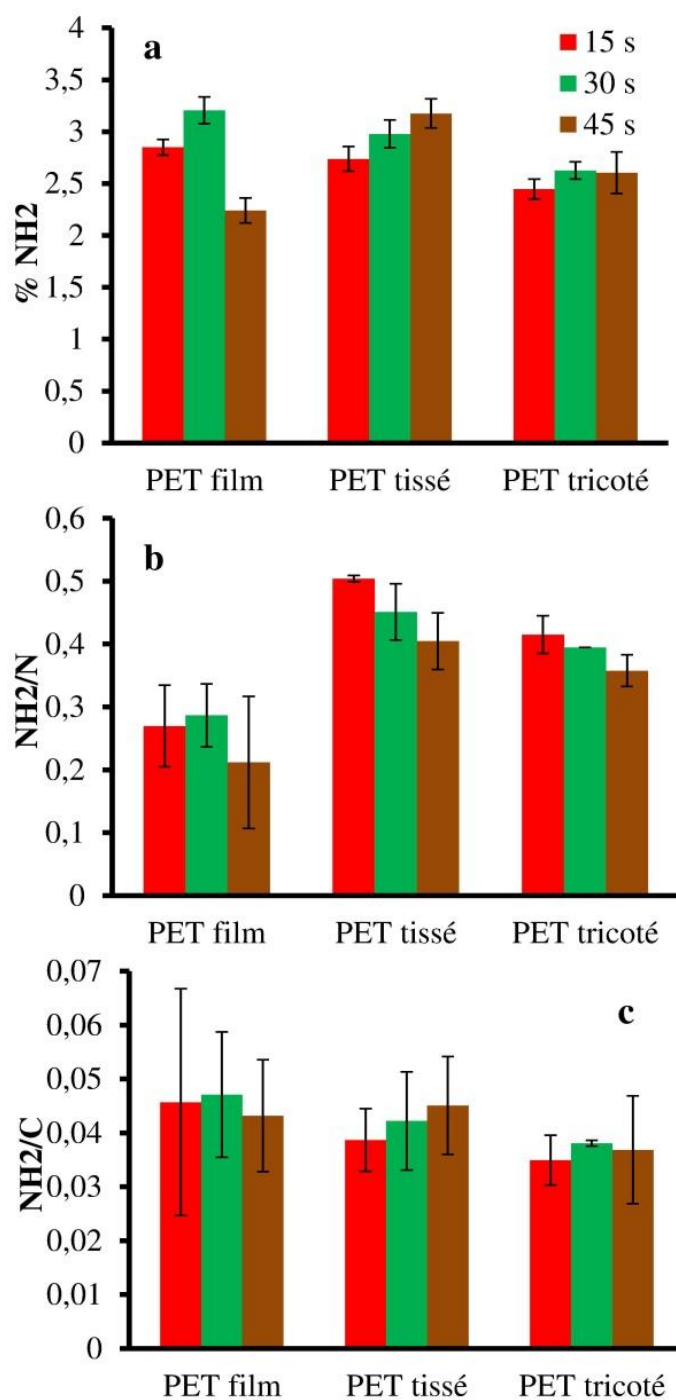


Figure 83. %NH₂ (a), NH₂/N (b) et NH₂/C (c) des échantillons traités par plasma après 15 s, 30 s et 45 s

En considérant les caractéristiques de surface liée aux amines primaires, on peut observer peu de différence entre les résultats. Le pourcentage de NH_2 sur la surface augmente très peu pour les prothèses vasculaires tandis que la sélectivité des groupements azotés en faveur des groupements NH_2 diminue légèrement en fonction du temps de traitement. Cette sélectivité est relativement élevée car 40 % à 50 % des groupements contenant de l'azote sont des NH_2 . Par contre, on observe très peu de variabilité en ce qui concerne le ratio atomique NH_2/C .

La Figure 84 montre l'évolution du rapport atomique O/C lié à l'endommagement de la surface. On voit que pour tous les échantillons, le rapport O/C diminue après le traitement plasma. D'une part, le traitement du film de PET par plasma conduit au même endommagement quel que soit le temps de traitement. D'autre part, le ratio diminue progressivement en fonction du temps de traitement des prothèses vasculaires.

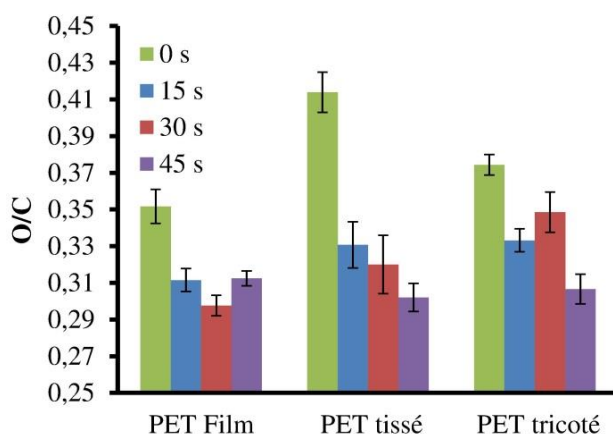


Figure 84. O/C en fonction du temps pour le film de PET et les structures textiles tissée et tricotée

La caractérisation de l'hydrophilicité a montré que l'angle de contact était d'environ 131° pour la prothèse tissée et environ 127° pour la tricotée avant traitement par plasma. Après traitement, la goutte est immédiatement absorbée par la surface ce qui montre une très forte hydrophilicité. De plus, les essais d'entreposage exposent que ces propriétés sont persistantes après 10 jours.

3.2 Caractérisation du recouvrement de nanofibres

La Figure 85 montre que le pourcentage de la surface recouverte par les fibres est relativement élevé après 1 passage à la vitesse maximum que peut atteindre le moteur de la glissière ($78 \% \pm 5 \%$). Après 3 passages à la vitesse de 2,5 mm/min, quasiment toute la surface ($94 \% \pm 1 \%$) de la prothèse est recouverte par des fibres. Ces résultats seront retenus pour la suite de l'étude. L'ajout des nanofibres dans ces conditions représentent une masse supplémentaire de maximum 8 % de la masse initiale.

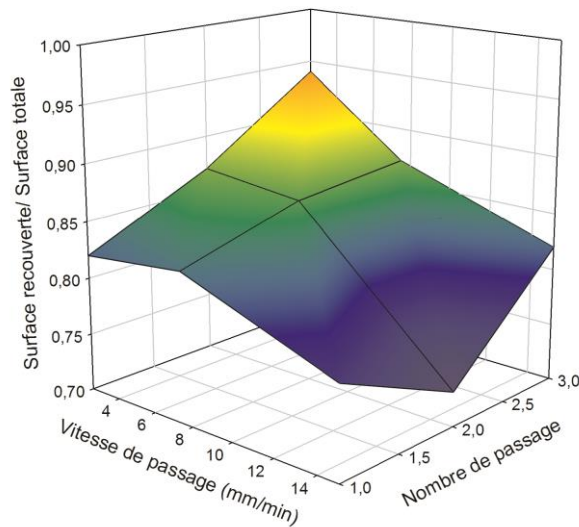


Figure 85. Evolution du pourcentage de la surface recouverte par des fibres en fonction de la vitesse et du nombre de passage

3.3 Caractérisation de l'adhésion des nanofibres sur la surface des prothèses vasculaires

La Figure 86 décrit la surface des rubans adhésifs après arrachement des fibres. On peut observer que la quantité de fibres qui a été retirée de la surface est de plus en plus faible en fonction du temps de traitement des films de PET. Ces résultats montrent que le traitement par plasma $N_2 + 5 \% H_2$ améliore significativement l'adhésion des nanofibres sur les prothèses vasculaires.

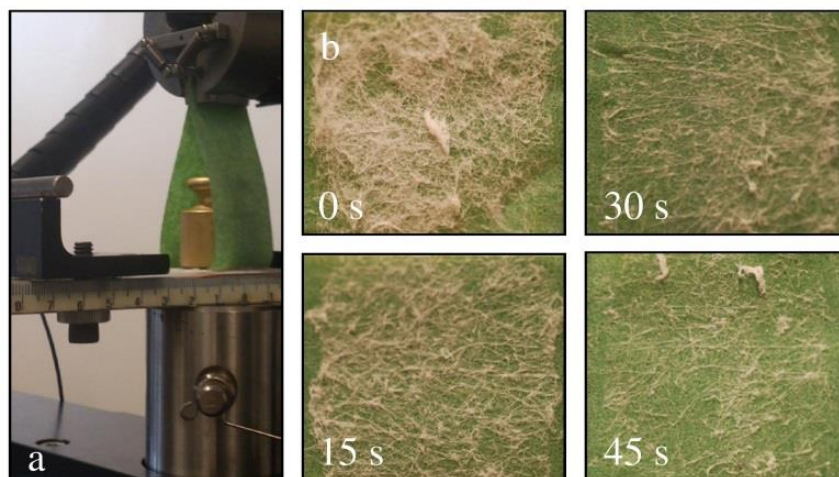


Figure 86. Arrachement des nanofibres à partir des films de PET. Les échantillons font 25 mm de côté.

Une chambre de flux a été conçue dans le but de caractériser l'adhésion des nanofibres sur les textiles mais aussi du comportement des cellules endothéliales sous flux pseudo-physiologique. Les résultats qualitatifs présentés à la Figure 87 montrent un échantillon de prothèse vasculaire tissée, après 45 s dans le réacteur plasma, recouverte de nanofibres à une vitesse de chariot de 2,5 mm/min et 3 passages et placée dans la chambre de flux pendant 1 h. On peut voir sur la Figure 87 que l'échantillon commence à se délaminer dans le sens du flux néanmoins l'adhésion du recouvrement de nanofibres sur les prothèses vasculaires permettrait de faire des essais d'adhésion des cellules endothéliales pendant 1 h sur les échantillons.

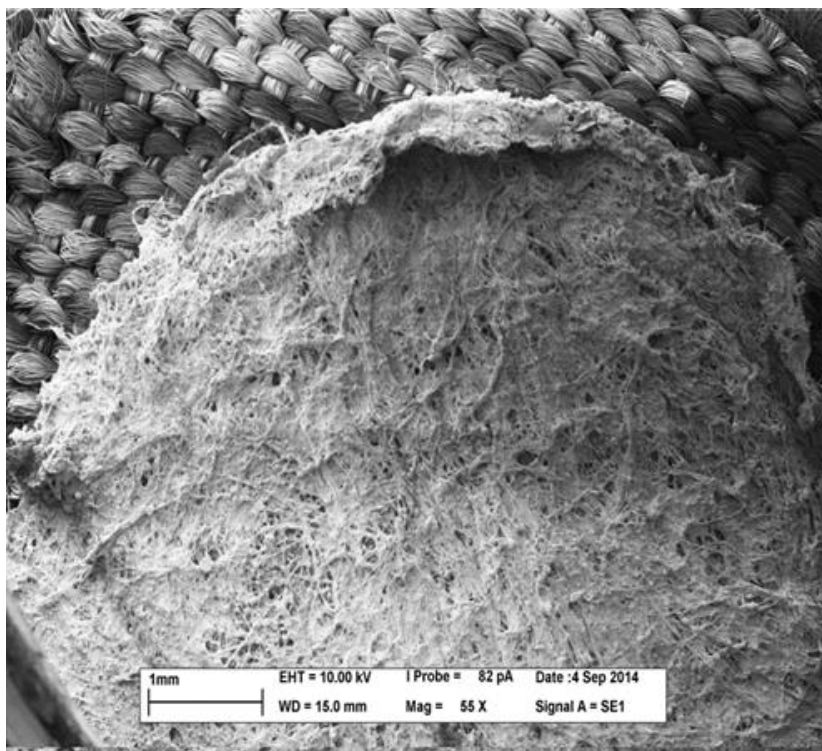


Figure 87. Prothèse tissée recouverte de nanofibres après 1 h dans la chambre de flux

4. Conclusion et perspectives

De manière générale, les résultats ont montrés que le traitement plasma $N_2 + 5\% H_2$ améliore l'adhésion des nanofibres. L'augmentation du temps de traitement n'a pas montré une réelle augmentation de groupement NH_2 néanmoins, le temps de traitement a une vraie influence au niveau macroscopique sur l'adhésion statique. De plus, il est nécessaire de travailler sur un plus grand intervalle du temps de traitement tout d'abord pour en déduire une possible optimisation du temps de traitement mais aussi, afin de mieux comprendre le mécanisme d'adhésion des nanofibres. En effet, les résultats sous-entendent que l'adhésion n'est pas proportionnellement liée au taux de NH_2 sur la surface et qu'un autre mécanisme pourrait être pris en compte comme l'hydrophilicité ou la rugosité. De ce fait, d'autres méthodes comme la microscopie à force atomique (AFM) ou la mesure d'angle de contact dynamique doivent être explorées afin d'en savoir plus sur ces mécanismes. L'adhésion des fibres doit être également quantifiée par l'exploitation des courbes de traction qui ont

montré jusqu'à maintenant des résultats qui nécessitent une multiplication du nombre d'échantillons. Finalement, les essais d'adhésion dynamiques doivent être poursuivis afin de prouver que des essais de culture cellulaire, par exemple en prolifération, peuvent être réalisés sur cette chambre. Si les fibres adhèrent à la surface, la chambre de flux pourrait également servir de milieu de dégradation dynamique.