

## Microstructures bioactives par électroimpression voie solvant pour la régénération tissulaire

Laura Bourdon

## ▶ To cite this version:

Laura Bourdon. Microstructures bioactives par électroimpression voie solvant pour la régénération tissulaire. Matériaux. Université de Lyon, 2019. Français. NNT: 2019LYSE1244. tel-02477598

## HAL Id: tel-02477598 https://theses.hal.science/tel-02477598

Submitted on 13 Feb 2020

**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.



N°d'ordre NNT : xxx

### THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON opérée au sein de

## l'Université Claude Bernard Lyon 1

## Ecole Doctorale N° 206 Chimie

Spécialité de doctorat : Chimie et science des matériaux

Soutenue publiquement le 12/11/2019, par : Laura BOURDON

## Microstructures bioactives par électroimpression voie solvant pour la régénération tissulaire

Devant le jury composé de :

El Kissi, Nadia Directrice de Recherche CNRS Université Grenoble Alpes Rapporteure Schlatter, Guy Professeur Université de Strasbourg Rapporteur Picart, Catherine Professeure Université Grenoble Alpes Examinatrice Fulchiron, René Professeur Université Lyon 1 Examinateur (Président)

Brioude, Arnaud Professeur Université Lyon 1 Directeur de thèse Salles, Vincent Maître de Conférences, Université Lyon 1 Co-directeur de thèse Marquette, Christophe Directeur de Recherche CNRS, Université Lyon 1 Invité Attik, Nina Ingénieure de Recherche CNRS, Université Lyon 1 Invitée

A mes très chers parents,

Cédric mon amour,

et mes amis qui m'ont soutenue pendant ces trois ans,

### **AVANT-PROPOS**

Ce travail de thèse a été effectué au sein du Laboratoire des Multimatériaux et Interfaces (LMI) à l'Université Lyon 1 sous la direction de M. Arnaud Brioude et M. Vincent Salles. Il s'inscrit dans le cadre d'un projet ANR Jeune Chercheur porté par M. Vincent Salles qui a débuté en 2016.

#### REMERCIEMENTS

La rédaction de cette thèse a permis de prendre beaucoup de recul sur ce projet de recherche mais a aussi permis de constater qu'un grand nombre de personnes m'aura soutenue et aidée durant ces trois ans.

J'aimerais tout d'abord remercier, M. Vincent Salles, porteur du projet ANR, pour m'avoir accordé sa confiance en me choisissant sur ce sujet de doctorat et pour son encadrement sans faille durant ces trois années. Je tiens à souligner sa grande disponibilité et son raisonnement scientifique toujours pertinent qui ont permis de me guider tout au long de ce travail. J'ai été aussi très sensible à son optimisme, ses qualités d'écoute et de bienveillance qui m'ont permis d'avancer sereinement dans ce projet. Je lui en suis très reconnaissante.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement M. Arnaud Brioude, mon directeur de thèse, pour m'avoir suivie pendant ce projet de recherche. Malgré ses disponibilités très restreintes, il a toujours su prendre le temps de suivre l'avancement de mon projet avec grand intérêt et apporter ses conseils avisés.

Je pense aussi aux personnes qui m'ont aussi beaucoup aidée dans ce travail de recherche. Je voudrais d'abord remercier M. René Fulchiron pour m'avoir aidée à caractériser la viscoélasticité des solutions de polymère et d'avoir pris le temps de m'expliquer les lois qui régissent les comportements rhéologiques. Je garderai les brouillons mêlant courbes et équations comme les œuvres d'art d'un scientifique passionné. Je remercie aussi M. Mathieu Maillard pour avoir participé à l'étude de la stabilité du jet sous champ électrique. Il m'aura beaucoup aidée dans la mise en place des dispositifs optiques et dans l'analyse de mes résultats. Cela a mené à des discussions scientifiques souvent très enrichissantes. Sa logique scientifique et sa capacité à la retransmettre sont un exemple pour moi. Je voudrais remercier M. Yannick Tauran pour avoir pris le temps de m'apprendre les bases de la culture cellulaire, l'analyse biochimique et les bonnes pratiques de laboratoire. Et bien évidemment, merci beaucoup de m'avoir accueillie comme il se doit à Tokyo. J'en garderai des souvenirs incroyables. Je remercie aussi Mme. Nina Attik pour m'avoir autant aidée pendant la fin de ma thèse pour l'étude biologique associée à la régénération parodontale. Malgré la quantité de travail surhumaine qu'elle mène quotidiennement, elle aura quand même pris le temps de mener à bien ce projet. Merci beaucoup.

Je n'oublie pas les personnes qui m'ont aidée de manière plus ponctuelle sur ce projet de thèse comme M. Jean-Christophe Maurin, Mme. Kerstin Gritsch, Mme. Rodica Chiriac, M. François Toche, M. François Cauwet et M. Laurent Mollet. Merci beaucoup pour votre aide. Je voudrais aussi remercier les personnes qui m'ont aidée sur certaines techniques comme M. Emmanuel Jondeau et Mme. Nathalie Grosjean pour la Vélocimétrie Laser à effet Doppler, M. Roland Montserret pour le Dichroïsme Circulaire, M. Anatoli Serghei pour les mesures de conductivité, M. Matthieu Denoual et Vivek Menon pour le STEM, Mme. Agnès Crepet pour la Chromatographie d'Exclusion Stérique et Véronica La Padula pour la microscopie confocale. Je n'oublie pas aussi M. Adrien Grelet qui m'a aidée à maîtriser cette imposante imprimante. De même, merci à Mme. Bérangère Toury pour son investissement dans le projet et Mme. Catherine Journet-Gauthier et toute l'équipe PSI pour leur bienveillance.

Je voudrais exposer toute ma gratitude à M. Eric Leclerc et Yasuyuki Sakaï Sensei pour m'avoir permis de faire ce séjour scientifique à Tokyo au sein du LIMMS et du Sakaï Lab.

Merci aussi aux étudiants qui m'ont aidée dans mon projet. Je pense à Oleh Andreiev, Paul Adbellaoui, Liza Belkessam, Mariia Tretiak et Saloua Saghir.

Je tiens enfin à vivement remercier Mme. Nadia El Kissi et M. Guy Schlatter d'avoir accepté le rôle de rapporteur et pour leur participation à mon jury de thèse. Je suis très reconnaissante de l'intérêt qu'ils portent à mon projet de recherche. De même, je remercie Mme. Catherine Picart, M. René Fulchiron et M. Christophe Marquette d'avoir accepté d'examiner mon travail et de faire partie de mon jury.

Ces remerciements seraient incomplets si je ne citais pas tous les bons moments passés avec Victor, Laura, Nelly, Irina, Gwenaël, Wenjun, Constance, Djamila, Léa, Cynthia et Kurt. Merci à eux pour leur soutien.

#### RESUME

Le dépôt localisé en électrofilage champ proche et voie solvant - ou appelé ici « électro-impression » - est une technique récente permettant de diriger le dépôt de filaments en combinant un jet de polymère stable et un collecteur amovible comme une technique de fabrication additive. Ce travail de thèse a eu pour objectif de développer la technique d'électro-impression afin de produire des structures bioactives pour l'ingénierie tissulaire. Le développement de la technique a été initié par une étude fondamentale pour comprendre les mécanismes de stabilité du jet de polymère sous champ électrique. Il a alors été mis en évidence qu'en augmentant la viscoélasticité des solutions par augmentation de la concentration ou de la masse molaire du polymère, des jets stables sans lasso pouvaient être obtenus. Ces résultats permettent désormais de considérer un nombre de matériaux plus important pour l'électro-impression. Les mécanismes d'empilement de filaments ont ensuite été étudiés pour *in-fine* limiter l'apparition de défauts lorsque la structure accumule un nombre de couches important. Les essais préliminaires sur l'utilisation d'un air humide, d'un air ionisé ou des deux polarités du champ électrique ont montré des résultats prometteurs pour contrôler l'empilement de filaments.

La protection et la libération de protéines à partir de filaments électrofilés est un défi toujours d'actualité pour l'ingénierie tissulaire. Ainsi, différentes formulations de polymères ont été testées afin de trouver un moyen de préserver au mieux la protéine. Une étude structurale d'une protéine modèle, l'albumine de sérum bovin (BSA), a été réalisée par dichroïsme circulaire afin de vérifier l'effet de la mise en forme sur l'activité de la protéine. Les résultats ont montré que la BSA était libérée à partir de filaments d'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) selon une structure très proche de sa structure native ce qui laisse supposer que l'électrofilage n'a que peu perturbé les propriétés de la protéine. La cinétique de libération de la protéine à partir de filaments de PLGA a aussi montré que la protéine était libérée en plus grande quantité en présence de poly(éthylène glycol) (PEG). La bioactivité de structures fibreuses contenant des agents de croissance a ensuite été étudiée pour des applications de régénération hépatique et parodontale. Dans le premier cas, le potentiel de régénération hépatique de filaments de PLGA avec le facteur « hepatocyte growth factor » (HGF) n'a pas été testé mais les filaments ont induit des comportements reproductibles et intéressants sur des cellules hépatiques HepG2 en fonction de la teneur en HGF dans les filaments. Concernant la régénération parodontale, deux structures fibreuses organisées ont été testées : une structure composite de poly(caprolactone) (PCL) contenant des nanoparticules d'hydroxyapatite et une structure de filaments cœur-coquille (PEG-PCL) contenant le facteur de croissance « cementum protein 1 » (CEMP1). Ces deux structures ont permis aux cellules du ligament parodontal de produire une matrice minéralisée ce qui n'a pas été observé sur les deux autres structures sans nanoparticules et sans CEMP1. Ces structures sont donc prometteuses pour la régénération de tissus minéralisés du parodonte comme l'os ou le cément.

Mots clés : électrofilage, dépôt localisé champ proche, viscoélasticité, polymère résorbable, gradient de propriétés, protéine, régénération hépatique, régénération parodontale.

#### ABSTRACT

# Bioactive microstructures produced by direct-writing electrospinning for tissue regeneration

Direct-writing electrospinning is a recent technique able to deposit fibers with a stable polymer jet on a moving collector similarly to additive manufacturing. The aim of this work was to develop the solventbased direct-writing electrospinning technique and produce bioactive structures for tissue engineering applications. A first fundamental study has been carried out on the stability mechanism of the polymer jet under electric field. This study showed that a stable jet without whipping behavior could be obtained by increasing the solution viscoelasticity, playing with either the concentration or the molecular weight. Those results give rise to a new strategy to optimize solutions formulation, and enlarge the number of materials used for direct-writing electrospinning. Investigations on the filaments stacking have also been carried out in order to produce higher organized resorbable structures, without stacking defects. Preliminary tests showed that injection of humidified air, ionized air or the use of two polarities could reduce the number of stacking defects.

Protection and release of protein from electrospun filaments is still a current challenge for tissue engineering. Then, different polymer formulations with a model protein, bovine serum albumin (BSA), was tested to find a way to preserve the conformation of the protein, and thus its bioactivity. The structure of bovine serum albumin (BSA) was investigated by circular dichroism to check protein activity. Released BSA in water from poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) filament had a similar structure to its native one which means that electrospinning had a relatively low effect on BSA structure or that BSA showed a good structure reversibility. The kinetic release of BSA from PLGA filaments also showed that the presence of poly(ethylene glycol) (PEG) allowed a higher amount of BSA to be released. The bioactive potential of filaments containing growth factors was tested for a hepatic and periodontal regeneration. The hepatic regenerative potential of PLGA filaments containing hepatocyte growth factors (HGF) could not be tested but a reproducible effect was noticed on hepatocyte cells HepG2 according to the amount of HGF in the filaments. Concerning the periodontal regeneration, periodontal ligament cells (PDLC) were cultured on different organized structures: one composite made of poly(caprolactone) (PCL) and hydroxyapatite nanoparticles and the other one is made of coreshell PEG-PCL filaments containing cementum protein 1 (CEMP1). The two structures allowed the PDLC to produce a mineralized matrix which was not the case for the two other structures without nanoparticles and CEMP1. Thus, those bioactive structures showed promising regenerative potential for hard tissues like bone or cement.

Key words: solvent-based direct-writing electrospinning, viscoelasticity, resorbable polymer, properties gradient, protein, hepatic regeneration, periodontal regeneration.

## LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

**3D** tridimensionnel

3DP	« tree-dimensions printing » – impression en trois dimensions
ηο	viscosité newtonienne
η <sub>spéc</sub>	viscosité spécifique
ηs	viscosité du solvant
[ŋ]	viscosité intrinsèque
λ	temps de relaxation
λ <sub>w</sub>	temps de relaxation moyen en masse
λ <sub>n</sub>	temps de relaxation moyen en nombre
AM	activité métabolique
ATG	analyse thermogravimétrique
BSA	albumine de sérum bovin
c-Met-P	c-Met phosphorylé
C-Y	Carreau-Yasuda
САР	« cementum-derived attachment protein »
CEMP1	« cementum protein 1 »
CES	chromatographie d'exclusion stérique
DC	dichroïsme circulaire
DSC	« differential scanning calorimetry » - calorimétrie différentielle à balayage
DT	distance de travail
FA	fabrication additive
FDM	« fused deposition modeling »
G*	module complexe
G'	module de conservation
G"	module de perte
НАР	hydroxyapatite
HFIP	hexafluoroisopropanol
HGF	« hepatic growth factor »
іт	ingénierie tissulaire

LJS	longueur de jet stable
MEB	microscopie électronique à balayage
MEC	matrice extra cellulaire
MET	microscopie électronique à transmission
Mw	Masse molaire moyenne en masse
NP	nanoparticules
PBS	« phosphate buffered saline »
PCR	« polymerase chain reaction »
PEG	poly(éthylène glycol)
PEO	poly(oxyde d'éthylène)
PCL	poly(caprolactone)
PDLA	acide (D)-(L) poly(lactique)
PDLC	cellules du ligament parodontal
PGA	acide poly(glycolique)
PLA	acide poly(lactique)
PLGA	acide poly(lactique-co-glycolique)
PLLA	acide (L) poly(lactique)
PVA	poly(alcool vinylique)
RGD	séquence peptidique arginine (ARG), glycine (GLY), acide aspartique (ASP))
STL	stéréolithographie
Tf	température de fusion
Тg	température de transition vitreuse
TGFs	« transforming growth factors »
ToF-SIMS	« time-of-Flight secondary ion mass spectrometry »
UV	ultraviolet

### SOMMAIRE

List	e des a	bréviations et symboles	.XI
Intr	oductio	on généraleX	VII
Cha	pitre 1	. Etat de l'art	. 1
1	. Dév	eloppement de structures pour faire face aux enjeux de l'ingénierie tissulaire	. 3
	1.1	Enjeux et objectifs de l'IT : de la biologie cellulaire aux matériaux	. 3
	1.2	Les techniques de mise en forme de structures biomimétiques	11
2	. L'éle	ectrofilage voie solvant pour l'élaboration de structures biomimétiques 3D	15
	2.1	L'électrofilage conventionnel	15
	2.2	Techniques émergentes d'électro-impression	23
3	. Con	clusion	30
Cha	pitre 2	Etude du comportement et des propriétés viscoélastiques du jet en électrofila	ge
cha	mp loi	ntain	33
1	. Con	texte et objectifs	35
2	. Mat	tériel et méthodes	37
	2.1	Composés et solutions	37
	2.2	Essai d'électrofilage	37
	2.3	Analyse du comportement du jet en vol	39
	2.4	Analyse viscoélastique des solutions de polymères	41
3	. Cori	rélation entre propriétés viscoélastiques et comportement au filage	46
	3.1	Caractérisation rhéologique des solutions de polymère	46
	3.2	Evolution de la stabilité du jet de polymère	52
	3.3	Morphologie du matériau déposé par électrofilage	56
4	. Evo	lution des propriétés viscoélastiques du jet de polymère	61
	4.1	Evolution du diamètre et de la vitesse du jet	62
	4.2	Détermination du flux d'évaporation	69
5	. Con	clusion	76
Cha pro	apitre 3 che po	3 Observations et étude des phénomènes associés au dépôt localisé en chan ur la production de structures organisées	np 79
1	. Obje	ectifs et contexte	81
2	. Mat	ériels et méthodes	82
	2.1	Composés et solutions	82
	2.2	Système d'électro-impression	82
	2.3	Création du GCode	84
	2.4	Caractérisation des structures	85

Anne	xe		199
Concl	lusior	ngénérale	193
2	2.5	Conclusion	189
2	2.4	Etude biologique des structures organisées contenant du CEMP1	182
2	2.3	Etude biologique des structures de PCL contenant des nanoparticules d'hydro 173	oxyapatite
2	2.2	Matériels et méthodes	167
2	2.1	Contexte et objectifs	
2.	Etud	le biologiques de structures électrofilées pour la régénération parodontale	164
1	5	Conclusion	161
1	4	Etude biologique des structures produites	153
1	3	Optimisation du protocole de stérilisation et cytotoxicité	145
1	.2	Matériels et méthodes	137
1	1	Contexte et objectifs	135
1.	Etud	le biologique de structures électrofilées pour la régénération hépatique	135
Chap	itre 5	Etudes biologiques de structures électrofilées pour la régénération tiss	ulaire133
4.	Con	clusion	131
3	8.4	Cinétique de libération de la BSA à partir des filaments	129
3	8.3	Influence de l'électrofilage	121
3	8.3	Influence du polymère	118
3	8.2	Influence du solvant HFIP	116
3	8.1	Caractérisation de la BSA dans l'eau	115
3.	Résu	Iltats et discussion	115
2	2.5	Spectrophotomètre à microvolume NanoDrop <sup>™</sup>	
2	2.4	Dichroïsme circulaire	
2	2.3	Essais d'électrofilage	
2		BSA en solution	111
∠. ۲	ividt	Composés	111
1. ว	Con	texte et objectifs	109
Chap	Cont	teute de l'évolution de la structure secondaire d'une proteine electron	100
4.	Cond	ciusion	103
3	5.3	Neutralisation de charges electriques sur l'empliement de filaments	
3	3.2	Caractérisation des empilements de filaments et résolution du dépôt	
3	8.1	Optimisation des conditions de dépôt localisé et production de structures	86
3.	Résu	Iltats et discussion	86

éférences
-----------

### **INTRODUCTION GENERALE**

Depuis l'avènement de la culture de cellules souches dans les années 2000, la médecine régénérative suscite un espoir considérable : traitement de maladies cardiovasculaires, de maladies neurodégénératives, de cancers, de séquelles de traumatismes... Les applications étant nombreuses, la médecine régénérative fait même miroiter un vieux rêve de vie éternelle.

Pourtant, à ce jour, les études n'aboutissent que très peu sur une mise en application concrète d'un protocole ou d'un dispositif médical. La régénération de tissus biologiques ou d'organes à partir de cellules souches s'est avérée délicate et souvent incomplète. Plusieurs problématiques ont émergé comme la revascularisation limitée des tissus régénérés, la délivrance non contrôlée de biomolécules ou l'utilisation de structures non adaptées [1]. Ces problématiques tournent autour du fait que l'environnement physique et chimique dans lequel évoluent naturellement les cellules n'est pas suffisamment bien imité par les dispositifs mis en place pour que les cellules développent pleinement leur potentiel de régénération.

C'est une des raisons pour lesquelles différentes technologies ont été développées pour produire des structures biomimétiques. L'utilisation de la fabrication additive ou de bioréacteurs a notamment suscité un grand intérêt pour ces applications. Les bioréacteurs de taille réduite, aussi appelés « organon-chip », sont des puces microfluidiques dans lesquelles des cultures cellulaires peuvent être effectuées. L'avantage de ces biopuces est de mimer l'environnement dynamique dans lequel baignent naturellement les cellules, ce qui a donné naissance à des études très intéressantes [2]. L'utilisation et l'étude de la fabrication additive a augmenté de manière exponentielle depuis les années 2010. Des applications ont été trouvées dans le domaine industriel mais aussi beaucoup en ingénierie tissulaire car ces techniques offrent la possibilité de mimer et d'adapter l'environnement physique en trois dimensions des cellules selon des géométries presque illimitées. En plus d'être capable d'adapter la géométrie des structures, ces techniques sont aussi capables d'adapter les propriétés physico-chimiques du milieu dans l'espace en intégrant différents matériaux.

Le biomimétisme a été poussé encore plus loin car, récemment, des techniques de fabrication additive résolues à l'échelle micrométrique voire nanométrique ont été développées. Elles sont maintenant capables de produire des structures dont les dimensions sont proches des fibres nanométriques présentes dans l'environnement naturel des cellules (fibres de collagène, élastine). Parmi ces techniques, l'électro-impression pour laquelle des filaments micrométriques ou nanométriques sont déposés localement sous champ électrique se développe de manière intensive depuis une dizaine d'années pour ces applications. Elle est effectivement très prometteuse pour mimer de manière efficace l'environnement fibreux des cellules.

Ce travail de thèse s'est alors consacré au développement de cette nouvelle technique de fabrication additive basée sur de l'électrofilage voie solvant pour la production de microstructures biomimétiques résorbables. Les différentes problématiques qui gravitent autour de l'ingénierie tissulaire et de la technique d'électro-impression ont d'abord été introduites sous la forme d'un état de l'art en Chapitre 1.

Un des objectifs de l'ingénierie tissulaire étant de pouvoir utiliser différents type de matériaux pour adapter les propriétés physico-chimiques des structures, une partie de cette thèse (Chapitre 2) s'est intéressée à l'étude de la stabilité du filage de solutions de polymère sous champ électrique. La stabilité au filage est effectivement une condition cruciale pour la technique d'électro-impression. Ainsi, l'objectif a été d'étudier et de comprendre les phénomènes de stabilisation du jet de polymère sous champ électrique en fonction des propriétés viscoélastiques des solutions de polymère. Le but, à terme, est de pouvoir étendre la technologie à tout type de matériaux en ajustant leurs propriétés viscoélastiques.

Le développement de la technique s'est ensuite poursuivi par l'étude des mécanismes d'empilement des filaments en dépôt localisé. L'une des contraintes majeures de la technique est le nombre limité de couches qu'il est possible d'atteindre avant que le champ électrique ne soit perturbé. L'étude s'est alors consacrée à observer ces phénomènes et développer des stratégies pour les éviter. Ce travail est l'objet du Chapitre 3.

La délivrance contrôlée de biomolécules étant aussi un point crucial pour l'optimisation de la régénération tissulaire, ce sujet a fait l'objet d'une étude décrite en Chapitre 4. Dans ce cas, la structure secondaire d'une protéine modèle (l'albumine de sérum bovin) qui peut être témoin de son activité biologique a été étudiée en fonction de l'environnement qui lui est soumis en électrofilage. Le but a été de trouver une voie pour protéger au mieux la protéine pendant la mise en forme et qu'elle conserve ainsi son activité après libération.

Le potentiel de régénération cellulaire de structures produites sous champ électrique avec des protéines ou des agents bioactifs a ensuite été testé en Chapitre 5. Plusieurs structures ont été développées pour la régénération hépatique et pour la régénération parodontale.

Chapitre 1 Etat de l'art

# Développement de structures pour faire face aux enjeux de l'ingénierie tissulaire

Au vu d'une population de plus en plus vieillissante, le remplacement de tissus ou d'organes entiers défaillants représente un réel besoin pour la chirurgie actuelle. Les greffes d'organes, utilisées comme alternative à ce problème, sont contraintes à un manque cruel de donneurs et de nombreux problèmes d'incompatibilité et de rejets de l'organisme. Rapidement considérées comme des alternatives viables, l'ingénierie tissulaire (IT) et de la médecine régénérative ont alors suscité un engouement important [3].

#### 1.1 Enjeux et objectifs de l'IT : de la biologie cellulaire aux matériaux

Afin de pallier les problèmes d'incompatibilité et de manque de donneurs, le domaine de l'IT a pour ambition de reproduire des tissus biologiques ou des organes vivants. Ceux-ci seraient générés à partir de cellules souches ou de cellules du patient par l'intermédiaire d'un matériau poreux tridimensionnel et bioactif. Le principe est simple mais le défi est de taille car pour répondre à ces objectifs, il est nécessaire de rassembler les connaissances de disciplines très différentes comme l'ingénierie, la chimie des matériaux mais aussi la biologie cellulaire.

#### 1.1.1 Stratégie

Afin de pouvoir régénérer des tissus vivants et fonctionnels, il est d'abord important de comprendre l'organisation structurale des organismes vivants de l'échelle macroscopique à l'échelle nanométrique. Les organismes pluricellulaires sont caractérisés par un ensemble d'organes composés de tissus, euxmêmes composés d'un ensemble de cellules similaires. A chaque échelle (cellule, tissu, organe, organisme), ces ensembles forment des systèmes organisés, connectés et fonctionnels. L'objectif de l'IT serait de régénérer des organes entiers. Néanmoins, au vu de la complexité de ces systèmes, les études actuelles se portent pour l'instant sur la régénération de tissus biologiques à partir de cellules. Les tissus biologiques sont composés d'une partie cellulaire et d'une partie non-cellulaire. Pour ce qui est de la partie cellulaire, celle-ci est composée d'un ensemble de cellules similaires spécialisées pour une fonction. La partie non-cellulaire qu'on appelle aussi « Matrice Extra Cellulaire » (MEC) [4], est constituée d'un réseau de glycoprotéines sur lequel les cellules peuvent se fixer et migrer. En plus de former un support physique pour les cellules, cette matrice permet aussi de réguler un ensemble de mécanismes biologiques. Il existe un nombre important de tissus biologiques chez les animaux. Ils sont classés en 4 groupes suivant leur morphologie et leur fonction :

• Les tissus épithéliaux : ces tissus sont composés de cellules serrées les unes aux autres et ont souvent un rôle de revêtement car ils couvrent les surfaces en contact avec les milieux extérieurs et les cavités (exemple : épiderme de la peau) ;

• Les tissus conjonctifs : ces tissus sont constitués de cellules plutôt disjointes, séparées par la MEC et ont souvent un rôle de soutien (exemple : derme de la peau, os, cartilage, lymphe) ;

 Les tissus musculaires : ces tissus sont constitués de cellules contractiles qui permettent son mouvement (exemple : cellule cardiaque) ;

• Les tissus nerveux : ces tissus sont constitués de cellules organisées en réseau qui sont capables de transmettre des informations par impulsion électrique (exemple : neurone).

Les stratégies employées pour la régénération tissulaire se base sur les derniers progrès accomplis en biologie sur la compréhension des processus de cicatrisation ou du développement embryonnaire. Ces études ont permis d'affirmer que la régénération d'un tissu est possible en reconstruisant préalablement l'environnement bioactif dans lequel les cellules évoluent naturellement, la MEC [5]. En fonction de sa morphologie et des protéines qui la composent, cette matrice assure de manière spécifique l'intégrité, la fonctionnalité et la tenue mécanique propres à chaque tissu. La stratégie de l'IT consiste alors à reproduire des structures similaires afin de mimer ce microenvironnement favorable à la formation d'un néo-tissu. Ces structures se sont déjà révélées prometteuses mais pour être entièrement efficaces, elles doivent répondre à un cahier des charges précis (Figure 1-1). Il s'agit effectivement de concilier un procédé capable de fabriquer ce type de structure, avec un matériau adapté et une stratégie pour la rendre bioactive.



Figure 1-1 Schéma des différents enjeux à prendre en compte pour développer une structure biomimétique pour l'IT.

#### 1.1.2 Bioactivité de la structure biomimétique

La bioactivité de la structure biomimétique permet de favoriser le processus de régénération [6]. Dans le cadre de l'IT, la bioactivité consiste à favoriser la communication inter-cellulaire par le biais d'agents bioactifs comme des petites molécules ou des particules qui sont capables d'activer des mécanismes cellulaires comme la prolifération ou la différenciation – mécanismes clés de la formation d'un néo-tissu.

#### Stratégies

La bioactivité de la structure biomimétique peut être obtenue suivant plusieurs stratégies [7] : la thérapie cellulaire, la thérapie génique ou par l'intégration d'agents bioactifs.

La régénération tissulaire par thérapie cellulaire consiste à développer un tissu en intégrant des cellules saines au sein de la structure biomimétique. Les cellules agissent sur le renouvellement tissulaire suivant deux modes d'action [7]. Elles sont d'abord utilisées pour délivrer des facteurs de croissance ou autres molécules bioactives qui permettent d'activer le renouvellement d'un tissu (prolifération, migration, différenciation). Elles permettent aussi de débuter le processus de régénération sur la base de cellules saines. Les cellules souches, étant capables de se différencier en n'importe quelle cellule du corps, ont beaucoup été étudiées pour ce type d'application. La thérapie cellulaire reste néanmoins peu utilisée car la greffe de cellules implique des problèmes d'incompatibilité et l'autogreffe demeure contraignante.

La thérapie génique a pour principe d'intégrer un matériel génétique à une cellule cible pour activer ou inhiber un de ses gènes. Dans le cas de l'IT, les gènes cibles peuvent être les gènes responsables de la synthèse de molécules bioactives. Cette stratégie nécessite le développement d'objets cargo qui sont capables de délivrer spécifiquement le matériel génétique à une cellule [8]. La thérapie génique est efficace mais cette stratégie est seulement envisageable dans le cas où il reste des cellules saines au sein du tissu à régénérer.

La dernière stratégie consiste à intégrer des agents bioactifs au sein de la structure par liaison covalente, par adsorption ou simplement par enrobage dans la matrice du matériau [9]. La libération de ces agents au cours du temps peut être effectuée par diffusion ou lors de la dégradation de la structure [10]. Ce traitement a l'avantage d'être assez simple et d'éviter la production de molécules bioactives par l'intermédiaire de cellules mais, tout comme la thérapie génique, il est nécessaire que des cellules saines soient déjà présentes au sein du tissu à régénérer.

Il est aussi possible de combiner les stratégies entre elles pour donner lieu à des systèmes plus complexes mais très intéressants pour l'IT.

> Agents bioactifs pour la régénération tissulaire

Parmi les agents bioactifs souvent utilisés pour la régénération tissulaire, il est possible de trouver des biocéramiques pour la régénération osseuse et des protéines. Les protéines peuvent être des facteurs de croissance ou des facteurs d'adhésion [11].

Les facteurs de croissance sont des molécules capables d'induire des mécanismes comme la division ou la différentiation cellulaire. Elles induisent un comportement cellulaire en se fixant spécifiquement sur des récepteurs situés à la surface des cellules. Cette fixation va alors initier un processus signalétique intracellulaire en cascade qui aboutira par l'activation ou l'inhibition de gènes responsables de la division et de la différenciation cellulaire. Les facteurs de croissance utilisés en IT sont spécifiques à chaque application. Il est possible de retrouver différentes familles de facteurs de croissance [11], [12] :

- BMPs (Bone Morphogenic Proteins), capables d'influencer l'activité des ostéoblastes ;
- TGFs (Tranforming Growth Factors), permettant de gouverner la prolifération, la différenciation des cellules basales ou neuronales et osseuses ;
- FGFs (Fibroblast Growth Factors), influençant la migration et la prolifération de cellules endothéliales ;
- PDGFs (Platelet Derived Growth Factors) influencent la prolifération et la migration de cellules endothéliales.
- VEGFs (Vascular Endothelial Growth Factors), influençant la prolifération et la migration de cellules endothéliales ;
- IGFs (Insuline-like Growth Factors), gouvernant la prolifération cellulaire et permettant d'inhiber l'apoptose<sup>1</sup>.

Les facteurs d'adhésion [11] sont pour leur part des protéines fixées à la fois sur la matrice extracellulaire et sur les cellules environnantes. Elles ont une fonction de transmetteur mécanochimique entre la matrice et le cytosquelette des cellules qui permet l'adhésion des cellules. Les fibronectines, la laminine ou le collagène sont les facteurs d'adhésion les plus utilisés en IT. L'adhésion cellulaire causée par ces protéines est liée à leur séquence de trois peptides (arginine, glycine et acide aspartique) que l'on appelle « RGD » [13].

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> L'apoptose cellulaire correspond au processus suicide-cellulaire programmé

Les biocéramiques sont une catégorie que l'on peut assimiler aux matériaux mais aussi aux agents bioactifs. Effectivement, ces matériaux sont souvent utilisés pour la régénération osseuse pour leur caractéristique d'ostéoconduction et ostéoinduction. De par leur composition chimique assez proche de l'os, celui-ci développe une grande affinité pour ces matériaux et ainsi se régénérer plus facilement [14]. En IT, les biocéramiques sont les triphosphates de calcium, l'hydroxyapatite, et les verres bioactifs.

L'efficacité d'une structure pour l'IT est souvent caractérisée par le degré de prolifération des cellules au sein de la structure. Cette prolifération est encouragée à la fois par l'adhésion et la division cellulaire. C'est pourquoi il est intéressant d'utiliser plusieurs agents bioactifs pour promouvoir ces différents comportements cellulaires.

#### 1.1.3 Matériaux pour l'IT

Il existe un nombre important de matériaux intéressants pour l'IT. Pour chaque tissu à régénérer, le choix doit être fait judicieusement car le matériau peut intervenir en fonction de plusieurs paramètres biologiques.

#### > Caractéristiques des matériaux biocompatibles pour l'IT

Quoique tous différents, les matériaux pour l'IT possèdent un profil commun. Ils doivent être biodégradables et biocompatibles afin de n'induire aucune cytotoxicité<sup>2</sup> et limiter une réponse inflammatoire et immunitaire trop importante. Le choix se fait ensuite en fonction d'autres caractéristiques du matériau comme sa vitesse de dégradation et ses propriétés mécaniques.

Dans le domaine du biomédical, la biodégradation d'un matériau correspond à sa dégradation chimique ou enzymatique influencée par le milieu vivant dont les produits de dégradation ne sont pas toxiques et peuvent être éliminés par l'organisme. Dans le cas de l'IT, les matériaux utilisés doivent être biodégradables pour plusieurs raisons. Cela permet d'abord d'éviter une seconde chirurgie qui impliquerait automatiquement de nouvelles lésions du tissu déjà traité. De plus, une dégradation progressive permet de pouvoir transférer la charge que soutient la structure au tissu en cours de guérison, ce qui lui permettra de retrouver naturellement et progressivement ses fonctionnalités [3]. Enfin, la biodégradation du matériau peut aussi avoir une utilisation détournée intéressante qui est la délivrance d'agents bioactifs. Le principe d'utiliser une matrice biodégradable comme mode d'administration de médicaments est déjà largement exploité dans le domaine biomédical. Cela permet par exemple de contrôler la diffusion d'un agent bioactif dans le temps et dans un volume donné [10].

Il est important que le matériau utilisé possède des propriétés mécaniques similaires au tissu à régénérer. Effectivement il a déjà été démontré que la forme, la croissance, la différenciation mais aussi l'apoptose cellulaire était en partie influencées par des stimuli mécaniques détectés par les cellules [15]. Les propriétés mécaniques de la structure biomimétique utilisée pour l'IT gouvernent donc en partie la fonctionnalité finale du tissu régénéré. Ceci est d'autant plus vrai dans le domaine de l'orthopédie où le matériau doit répondre à des critères précis d'élasticité et de compressibilité [3].

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Cytotoxicité est la propriété d'une molécule à être toxique pour les cellules

#### Les différents matériaux utilisés en IT

En prenant en compte les caractéristiques citées précédemment, plusieurs matériaux tels que les polymères mais aussi les céramiques se sont avérés adaptés pour l'IT [16].

Les céramiques comme l'hydroxyapatite, le phosphate de calcium, le triphosphate de calcium et les bio-verres sont des matériaux très biocompatibles. Leurs propriétés mécaniques importantes permettent de régénérer de manière efficace des tissus minéralisés comme les os [17].

Les matériaux organiques pour l'IT sont les polymères naturels et les polymères synthétiques. Les polymères naturels comme les polysaccharides ou les protéines (collagène, chitosane...) sont très appréciés car ils induisent une excellente interaction avec les cellules et une réponse inflammatoire très faible. Cependant ils possèdent des propriétés mécaniques assez faibles.

Au vu de leurs grandes capacités de modulations mécanique et chimique, les polymères synthétiques sont les matériaux les plus utilisés pour ces applications. Leur dégradation se fait majoritairement par hydrolyse d'une de leur fonction chimique présente sur leur squelette. Les esters, les anhydres, les orthoesters ou les amides sont par exemple des fonctions chimiques sensibles à l'hydrolyse.

Tableau 1-1 Tableau comparatif des polymères biodégradables synthétiques couramment utilisés pour le biomédical [3], [18]

Polymère	Formule chimique	Température de transition vitreuse (°C)	Température de fusion (°C)	Pourcentage de cristallinité (%)	Module de traction ou flexion (GPa)	Elongation à la rupture (%)	Perte de propriétés mécaniques (mois)	Temps de dégradation complète (mois)
PLLA		60 - 65	173 - 178	37	2,7 - 4,8	5 - 10	9	24 - 72
PDLLA	لج وہ	55 - 60	Amorphe	Amorphe	1,9	3 - 10	1 - 2	12 - 16
PGA		35 - 40	220 - 225	45 - 55	7	15 - 20	1 - 2	6 - 12
PCL	$\left[\left\{c_{H_2}^{O}\right\}_{5}^{O}-0\right]$	-60	59 - 64	N. R.	0,4	300 - 500	К.	24 - 36

Il est délicat de comparer les différentes familles de polymères synthétiques car leurs propriétés mécaniques et leur temps de dégradation dépendent d'un nombre important de paramètres. Le type de polymérisation (polycondensation ou polymérisation par ouverture de cycle) ou la mise en forme

peuvent par exemple avoir une influence sur les propriétés physiques et la vitesse de dégradation du matériau. Quoiqu'il en soit, il est tout de même possible de trouver dans la littérature des études qui regroupent les caractéristiques généralement obtenues pour ces polymères (Tableau 1-1). Les polymères synthétiques les plus utilisés pour l'IT sont les polyesters suivants : l'acide polylactique (PLA), l'acide polyglicolique (PGA) et le polycaprolactone (PCL). La structure du PLA contenant plusieurs carbones asymétriques implique la présence de deux stéréoisomères : l'acide (L) polylactique (PLLA) et l'acide (D) polylactique (PDLA). La température de fusion (Tf) de ces polymères est entre 173 et 178°C, leur température de transition vitreuse (Tg) est entre 60 et 65°C et leur taux de cristallinité est en moyenne de 37%. Ils possèdent de plus un module de traction assez important d'environ 2,7 GPa et une élongation à la rupture plutôt faible, de l'ordre de 5 à 10%. Leur temps de dégradation est plutôt long : dans l'étude de Bergsma et al. en 1995 [19], des résidus de vis et de plaques de PLLA de 5000 g.mol<sup>-1</sup> (initialement 760000 g.mol<sup>-1</sup>) ont été retrouvés après avoir été implantés pendant plus de 5 ans. Concernant les PLA élaborés à partir d'un mélange des deux stéréoisomères et de conformation atactique PDLLA, leurs caractéristiques sont très différentes. Leur structure amorphe implique par exemple une Tg plus faible de 55 à 60°C, un module de traction plus faible de 1,9 GPa et une élongation à la rupture de 3 à 10%. Leur temps de dégradation est aussi plus faible car l'hydrolyse d'une structure amorphe est plus rapide. Il est possible d'observer une perte de propriétés mécaniques après 1 à 2 mois et une dégradation complète après 12 à 16 mois [20]. La dégradation complète des matériaux correspond au moment où la masse molaire du polymère dégradé devient suffisamment faible pour que celui-ci puisse être évacué par l'organisme.

Le PGA, le second polyester très utilisé en IT, possède un taux de cristallinité en général plus élevé que le PLA : entre 45 et 55%. De plus, il possède une Tf plus importante de 220 à 225°C, une Tg plus faible de 35 à 40°C, un module de traction plus important d'environ 7 GPa mais aussi des temps de dégradation plus cours. Un fil de suture en PGA perd par exemple 50% de ses propriétés mécaniques après 2 semaines et se dégrade totalement après 4 à 6 mois [21]. Il est aussi intéressant de noter que le PGA possède une élongation à la rupture plus importante que le PLA : entre 15 et 20%.

Un autre polyester, le PCL, est aussi très utilisé en IT. Il possède une Tf entre 59 et 64°C et une Tg d'environ -60°C. Ses propriétés mécaniques sont plus faibles que le PLA ou le PGA avec un module de traction d'environ 0,4 GPa. Il présente néanmoins un taux d'élongation à la rupture beaucoup plus important compris entre 300 et 500%. La dégradation du PCL est assez lente. Une étude in vivo de Sun *et al*. a par exemple démontré qu'un cylindre (2,3 mm de diamètre sur 2,3 cm de long) de PCL de 66000 g.mol<sup>-1</sup> pouvait garder sa forme jusqu'à 24 mois mais se dégrade en résidus de 8000 g.mol<sup>-1</sup> après 30 mois [22].

Il existe donc plusieurs polymères synthétiques biodégradables et biocompatibles possédant des propriétés très diverses. Mais la liste ne s'arrête pas ici puisque, comme expliqué précédemment, les polymères synthétiques sont très modulables chimiquement. Il est donc par exemple possible de combiner les caractéristiques de deux ou plusieurs polymères en synthétisant leur copolymère comme il l'est souvent fait pour le PLA et le PGA [23]. Dans d'autres cas, il est possible d'augmenter les propriétés mécaniques et les temps de dégradation par réticulation des chaînes [24].

En plus des propriétés mécaniques et de la cinétique de dégradation, d'autres critères peuvent aussi rentrer en compte dans le choix du matériau comme sa facilité de mise en forme et de stérilisation [25].

#### 1.1.4 Topologie et architecture

L'architecture de la structure biomimétique représente un défi pour l'IT. Les enjeux sont multiples car il s'agit d'optimiser à la fois la géométrie externe et la porosité interne de la structure. Concernant la forme externe, elle doit effectivement pouvoir s'adapter à son environnement pour que le matériau puisse combler le vide du tissu manquant ou le remplacer sans être trop invasif. Concernant ensuite la porosité de la structure, il a été démontré que celle-ci pouvait influencer de manière importante les mécanismes biologiques. Les caractéristiques de la géométrie interne de la structure pour obtenir une régénération optimale sont assez peu connues mais le sujet est de plus en plus étudié. Il a, par exemple, été remarqué que la taille, l'interconnectivité et la morphologie des pores sont des paramètres influents sur des mécanismes biologiques comme la migration ou la différenciation cellulaire [26].

#### > Taille et interconnectivité des pores

Les dimensions de pores qui ont une influence sur la migration cellulaire sont entre la centaine de nanomètres à la centaine de micromètres. Dans le domaine des matériaux, on appelle « microporosité » les pores de diamètre inférieur à 2 nm, « mésoporosité » les pores entre 2 et 50 nm et « macroporosité », les pores de diamètre supérieur à 50 nm [27]. Néanmoins, dans la plupart des articles de la littérature traitant de l'influence de la porosité sur le comportement cellulaire, les pores de diamètres entre 100 nm et 10  $\mu$ m sont appelés « microporosité » et les pores de diamètres de 10  $\mu$ m à 500  $\mu$ m sont appelés « macroporosité ». Il semblerait que ces deux types de porosité puissent avoir des influences très différentes sur le comportement biologique des cellules.

Dans le cas de pores de diamètres entre 100 nm et 10  $\mu$ m, qui sont généralement plus petits qu'une cellule, des études ont mis en évidence que ceux-ci se comportent comme point d'ancrage et permettent donc de favoriser l'adhésion de certain type cellulaire. Par exemple dans l'étude Lee *et al.* 2004 [28], il a été montré que les pores de diamètre entre 0,2 et 1  $\mu$ m permettaient de favoriser l'adhésion et la prolifération d'ostéoblastes sur des membranes de polycarbonate. Dans cette même étude, il a aussi été remarqué que la microporosité influençait la forme des cellules, preuve de leur différente activité biologique. Sur une surface contenant des pores de taille entre 0,2 et 1  $\mu$ m, les cellules adoptent une forme plutôt allongée alors que pour des pores de taille entre 3,0 et 8,0  $\mu$ m, les cellules adoptent une forme plus sphérique.

Dans le cas de pores de diamètres entre 10  $\mu$ m et 500  $\mu$ m, les pores vont permettre d'ajuster la migration des cellules car la taille des pores et des cellules sont du même ordre de grandeur. Pour cette optimisation, un compromis doit être trouvé. La taille des macro-pores doit d'abord être suffisamment importante pour permettre la migration des cellules, la revascularisation du tissu et le renouvellement des fluides transportant les nutriments et l'oxygène. Néanmoins, les macro-pores doivent aussi être suffisamment petits pour maintenir les propriétés mécaniques du matériau et éviter un flux trop important à travers la structure qui risque d'entrainer les cellules plutôt que de permettre leur adhésion [26]. L'étude de Lee et al, *2010* [29] présente par exemple l'influence de la macroporosité d'une structure en poly(propylène fumarate) sur des pré-ostéoblastes et conclut que les pores de 350  $\mu$ m de diamètre permettaient d'atteindre un meilleur taux de prolifération. Il est important de noter que la taille optimale des pores est complètement dépendante du tissu à régénérer. Dans le cas de la régénération de cartilage (ménisque), une étude a démontré que, parmi trois diamètres de pores testés (215, 320 et 515  $\mu$ m), des pores de 215  $\mu$ m de diamètre était dans ce cas la taille la plus appropriée [30].

La taille des macro-pores est un paramètre important pour optimiser la migration des cellules mais seulement dans le cas où le réseau est constitué de pores interconnectés. Ces interconnectivités sont

donc aussi nécessaires pour permettre aux cellules de se propager de manière uniforme dans la structure.

> Morphologie des pores

La morphologie des pores est un paramètre aussi très influant sur les mécanismes biologiques et les propriétés mécaniques du matériau. L'étude de Yilgor *et al.* 2008 [31], l'a par exemple démontré en caractérisant des structures de PCL composées de filaments suivant différentes configurations (Figure 1-2) que l'auteur appelle basic (a), basic-offset (b), crossed (c) et crossed-offset (d)<sup>3</sup>. Les structures ont été caractérisées mécaniquement avant d'être testées *in vivo* chez la souris pour une régénération osseuse.



Figure 1-2 Images MEB de différentes structures utilisées pour tester l'influence de la géométrie des pores sur le comportement cellulaire in vivo pour la régénération osseuse [31]. L'auteur nomme ces quatre géométries : (a) basic, (b) basic-offset, (c) crossed, (d) crossed-offset

Les tests mécaniques ont révélé que les structures qui ne sont pas « offset » (a et c) et qui sont sous forme de motifs « basic » (a et b) possèdent des propriétés mécaniques plus importantes. A contrario, les tests biologiques ont révélé que les structures « offset » (b et d) permettent un taux de prolifération des cellules plus important. L'auteur a justifié cette différence par la plus grande surface de contact entre filaments et cellules pour les structures « offset ».

La porosité optimale des structures biomimétiques reste encore peu connue pour l'IT car les connaissances des relations entre architecture et comportement biologique sont limitées. Ce type d'étude représente un travail important car la combinaison optimale entre taille et morphologie de la porosité dépend de chaque type cellulaire. Néanmoins, la tendance pour tout type cellulaire est qu'une structure présentant une large surface spécifique grâce à une porosité importante favorise l'adhésion et la prolifération cellulaire.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> L'auteur appelle « basic » les structures composées de filaments croisés perpendiculairement, « crossed » celles qui sont composés de filaments croisés en diagonale et « offset » les structures composées de couches de filaments décalées par rapport à la couche précédente.

L'objectif de cette partie était de surligner les différentes problématiques et enjeux liés au domaine de l'IT et à l'élaboration de structures biomimétiques. Le développement d'une telle structure n'est pas simple car celle-ci doit répondre à un cahier des charges rigoureux. Il est important de choisir judicieusement une stratégie pour rendre la structure bioactive, un matériau et une architecture pour chaque tissu à régénérer car l'ensemble de ces paramètres possède une influence majeure sur le comportement biologique des cellules.

#### 1.2 Les techniques de mise en forme de structures biomimétiques

A ce jour, un nombre relativement important de techniques de mise en forme a été utilisé pour produire des structures pour l'IT. Les différents critères que doivent remplir les structures étant nombreux et contraignants, chacune des techniques possède ses avantages et inconvénients. Suivant les géométries et la résolution possibles, les techniques ont été classées en deux catégories : les techniques « conventionnelles » et les techniques de Fabrication Additive (FA).

#### 1.2.1 Techniques conventionnelles

Dans la littérature, il est possible de trouver plusieurs techniques conventionnelles pour l'IT [16] : la séparation de phase [32], le moussage [33], le lessivage de particules [34] ou l'électrofilage [35].



Figure 1-3 Images des structures qu'il est possible d'obtenir à partir des techniques de mise en forme dites conventionnelles pour l'IT. (a) Structure de PLA/PEG obtenue par moussage à 25°C et 160 bar [33]. (b) Structure de PCL obtenue par lessivage de particules de NaCl et PEO [36]. (c) Filaments de PEO électrofilés [35]

Ces techniques permettent de produire des structures très poreuses (Tableau 1-2). Les structures ont donc l'avantage de présenter une grande surface d'échange avec un milieu biologique et donc de promouvoir l'adhésion cellulaire. Cependant, l'inconvénient de ces techniques est qu'elles ne permettent pas de contrôler de manière précise la taille et la forme des pores et ne permettent donc pas d'optimiser la migration cellulaire. De plus, ces procédés de mise en forme manquent souvent de régularité (Figure 1-3).

Tableau 1-2 Liste non exhaustive des avantages et inconvénients majeurs des techniques traditionnellement utilisées pour l'ingénierie tissulaire.

TECHNIQUES	AVANTAGES	LIMITES
Séparation de phase	Pores interconnectés	Taille de porosité limitée
Moussage	Pas de solvant utilisé	Taille de porosité limitée Morphologie de pore non contrôlée
Lessivage de particules	Porosité contrôlée Technique simple à mettre en œuvre	Taille de porosité limitée
Electrofilage conventionnel	Grande surface de contact Porosité importante (70-80%)	Taille de porosité limitée et de taille réduite. Structure limitée au 2D

#### 1.2.2 Techniques de Fabrication Additive

De par leur avantage de pouvoir produire des structures aux formes presque illimitées, les techniques récentes de Fabrication Additive (FA) sont de plus en plus utilisées dans le monde industriel et aujourd'hui pour l'IT. Elles permettent effectivement de dépasser les limites des techniques conventionnelles en contrôlant avec une grande reproductibilité la taille, la forme, la distribution, l'interconnectivité des pores et la forme extérieure.

Les techniques de FA, anciennement appelées « Prototypage rapide » et aujourd'hui plus communément appelées techniques « d'impression 3D », sont des technologies capables de produire des structures 3D complexes par l'empilement couche par couche de matière en 2D. Le choix de l'architecture de l'objet est presque complètement libre car la formation de chaque couche est guidée par schéma numérique prédéfini par ordinateur. La fabrication d'un objet par FA est divisée en cinq phases (Figure 1-4). L'objet est d'abord modélisé sur ordinateur suivant la géométrie et les dimensions voulues. Le modèle numérique est ensuite codé en un format lisible par les machines de FA comme le format «. STL ». Grâce à un logiciel, l'étape suivante consiste à détailler l'objet numérique en une multitude de couches. Le logiciel génère alors un fichier texte contenant toutes les commandes importantes pour la machine d'impression 3D (coordonnées de déplacement, vitesses, température). Ce fichier, appelé le « GCode », est ensuite lu par le logiciel de pilotage de l'imprimante pour fabriquer la pièce de manière autonome. La dernière étape concerne le post-traitement qui peut consister à gommer les défauts de fabrication (traitements de surface). Les techniques de FA sont classées en 7 familles selon la norme ISO 17296-2 :2014<sup>E</sup>[37], [38]: la photopolymérisation, la projection de matière, la projection de liant, la fusion sur lit de poudre, l'extrusion de matériau, la lamination de feuilles, et la « direct energy deposition ».



Figure 1-4 Différentes étapes de la conception d'un objet par FA [39]

Les avantages de la FA pour l'IT sont nombreux. Par rapport aux techniques de mise en forme conventionnelles, ces fabrications assistées par ordinateur permettent de contrôler et d'adapter la forme externe et la géométrie interne de la structure biomimétique. Le contrôle de la forme externe permet ainsi d'ajuster la géométrie d'une pièce imprimée à la zone à traiter sans perturber l'environnement voisin. La forme anatomique que doit adopter cette structure peut être déterminée grâce à un scanner ou un IRM du patient. Le contrôle de la géométrie interne permet d'autre part d'adapter la forme et la taille des pores de la structure afin de moduler le comportement cellulaire en fonction du tissu à traiter. Comme expliqué en partie 1.1.4 (page 9), les pores de diamètres allant de 100 nm jusqu'à 500 µm peuvent avoir une influence importante sur le comportement cellulaire. Les techniques de FA ont généralement une résolution de l'ordre de la centaine de micromètre, ce qui ne permet donc pas de contrôler la géométrie à l'échelle du micromètre ou de la centaine de nanomètre. Afin de maîtriser parfaitement la géométrie et le comportement cellulaire, il est donc intéressant d'utiliser des techniques de FA haute résolution.

#### 1.2.3 Les techniques de FA haute résolution

Les techniques de FA haute résolution permettant de produire des structures très fines et résolues<sup>4</sup>, sont très intéressantes pour produire des structures pour l'IT.

Les techniques de FA permettant une telle résolution sont les techniques basées sur la photopolymérisation. Parmi elles, la stéréolithographie deux-photons offre des résolutions généralement de l'ordre de la centaine de nanomètre [40] et pouvant aller jusqu'à 52 nm [41]. Cette technique consiste à photo-polymériser localement un très faible volume de résine liquide photosensible à l'aide d'un laser. Elle permet de produire des structures 3D avec une géométrie complexe et des dimensions

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> La résolution d'une technique de mise en forme correspond à la plus petite distance que peut séparer deux objets distincts produits. La précision renvoie, de son côté, au degré de reproductibilité de la technique.

nanométriques, et ainsi d'élargir de manière importante la gamme d'architectures pouvant être étudiées pour l'IT. Néanmoins, cette technique a l'inconvénient de ne pouvoir mettre en forme que des résines photosensibles. Même si de nouvelles résines ont pu être développées [42], cela réduit tout de même la gamme de matériaux pouvant être utilisée. De plus, il n'est pas facile d'incorporer des agents bioactifs comme des protéines dans la structure car les résines sont souvent toxiques et le laser peut les dégrader [43].

Depuis une dizaine d'années, une nouvelle technique haute résolution s'est développée : le « Direct-Writing Electrospinning ». Aucune terminologie française de cette technique n'existe encore. Nous appellerons alors cette technique qui utilise un champ électrique pour étirer la matière, l'électroimpression. Il s'agit d'une technique dérivée de l'électrofilage et de la technique de FA par extrusion de matériaux. La combinaison des deux techniques permet de profiter des avantages qu'elles offrent : les techniques de FA par extrusion de matériaux ont l'avantage de pouvoir utiliser une large gamme de matériaux et l'électrofilage a l'avantage de pouvoir former des filaments de diamètres très fins (d'une centaine de nanomètres à une dizaine de micromètres). C'est ainsi que des structures 3D très fines peuvent être produites.

Avant de décrire de manière plus approfondie cette technique et ses applications en ingénierie tissulaire (partie 2.2), une présentation de la technique d'élecrofilage sur laquelle est basée l'électroimpression, est d'abord exposé en seconde partie de ce chapitre bibliographique.

# L'électrofilage voie solvant pour l'élaboration de structures biomimétiques 3D

L'électrofilage est aujourd'hui considéré comme une technique de choix pour produire des filaments de diamètre allant d'une dizaine de micromètres à une centaine de nanomètres. Elle est effectivement la seule technique capable de produire des filaments continus et qui permet de mettre en forme une large gamme de matériaux. Son faible coût de mise en œuvre a permis son utilisation à l'échelle industrielle pour plusieurs types d'applications comme la filtration [44], l'élaboration de capteurs [39][40], et l'élaboration de structures biomimétiques pour l'IT [35]. Après avoir expliqué son principe et son intérêt pour l'IT, la seconde partie traitera du couplage entre l'électrofilage et une technique de FA pour donner lieu à l'électro-impression.

#### 2.1 L'électrofilage conventionnel

L'électrofilage consiste à déformer et étirer une goutte d'un liquide visqueux en un filament sous l'influence d'un champ électrique. Les filaments électrofilés peuvent être élaborés à partir d'une solution de polymère (voie solvant) ou de polymère fondu (voie fondue). Le procédé et les paramètres modulables seront expliqués plus en détails après être revenu sur quelques dates clés de l'histoire de l'électrofilage.

#### 2.1.1 Historique de l'électrofilage

Le principe de cette technique est assez ancien mais a seulement été exploité à partir des années 1990. Effectivement, la première étude ayant mis en évidence la possibilité de déformer une goutte sous l'action d'un champ électrique date du XVIIème siècle [47]. Le phénomène a été observé par l'anglais W. Gilbert en approchant de l'ambre électrifié par frottement vers une goutte d'eau. La goutte d'eau se déforme sous la forme d'un cône à partir duquel, si l'électrification est suffisamment intense, des gouttelettes peuvent être éjectées. Une longue période s'est ensuite écoulée pendant laquelle de nombreuses connaissances sur l'électricité et la physico-chimie des polymères se sont accumulées. L'année 1887 peut être considérée comme le début de l'histoire de l'électrofilage car c'est à cette date que le physicien Charles Vernon Boys décrivit pour la première fois un procédé de filage sous champ électrique pouvant être, selon lui, appliqué à n'importe quel fluide visqueux [48]. En 1900 [49] et 1902 [50], John Francis Cooley déposa deux brevets sur des procédés d'électrofilage de même que William James Morton, en 1902 [51]. En 1914, John Zeleny publia des travaux sur le comportement d'une goutte à la pointe d'un capillaire métallique sous champ électrique [52] et mis en évidence la relation entre l'instabilité du liquide et la présence de charges à sa surface. Anton Formhals permit de grandes avancées en termes de procédé d'électrofilage avec au total 22 brevets déposés entre 1931 et 1944 [53]. Les procédés décrits dans ces brevets prennent la forme des appareillages industriels toujours utilisés aujourd'hui. A. Formhals étudia par exemple la forme la plus adaptée de l'aiguille [54] et développa un procédé permettant l'assemblage de filaments pour la formation d'un fil [55]. Un autre contributeur de l'avancée de l'électrofilage, Charles Ladd Norton, déposa un brevet en 1936 [56] sur l'appareillage permettant de former un filament sous champ électrique à partir d'une goutte de polymère, fondu cette fois-ci. Geoffrey Ingram Taylor fit de nombreux travaux entre 1964 et 1969 [57] sur la modélisation du cône que forme la goutte en présence d'un champ électrique, ce qui lui donna son nom : « le cône de Taylor ». C'est enfin dans les années 1990 que plusieurs groupes notamment celui de Reneker [58] ont démontré l'intérêt et la possibilité d'électrofiler un filament très fin avec un
nombre important de polymères organiques. C'est alors à partir de ces études que le nombre de projets et de publications sur l'électrofilage a augmenté de manière exponentielle jusqu'à aujourd'hui.

- 2.1.2 Description du procédé conventionnel
  - Principe et appareillage

Comme expliqué précédemment, l'électrofilage est capable de former des filaments à partir d'une goutte de polymère en solution ou de polymère fondu. La première étape du procédé consiste à extruder le matériau à travers une aiguille selon un débit continu (Figure 1-5). Un champ électrique est ensuite appliqué entre l'aiguille et un support conducteur sur lequel viennent se déposer les filaments. L'application de ce champ va engendrer la création de charges électriques au sein du matériau liquide et leur accumulation à sa surface. Lorsque le champ électrique, et donc le nombre de charges électriques, devient suffisamment important, la force d'attraction électrostatique entre les charges électriques et le collecteur (généralement connecté à la masse électrique) va dépasser la force de tension superficielle qui maintient la goutte sous forme sphérique et provoquer sa déformation sous la forme d'un cône (« Cône de Taylor »). Lorsque les propriétés du matériau et de l'appareillage le permettent, le liquide est alors éjecté du cône sous la forme d'un filament.



Figure 1-5 Schéma d'un appareillage typique utilisé pour l'électrofilage (A). Image MEB d'un dépôt de filaments électrofilés de PCL fait à partir d'une solution à 12% (w/v) de polymère dans du tri-fluoroéthanol (B) [59]

La trajectoire du jet de polymère entre l'aiguille et le collecteur est très spécifique de l'électrofilage. Deux zones de jet peuvent être distinguées. A l'extrémité du cône de Taylor, le jet commence par adopter une trajectoire rectiligne de plusieurs millimètres de long, en général (Figure 1-5) : il s'agit de la zone stable. Selon le théorème d'Earnshaw, un ensemble de charges électriques ponctuelles ne peut pas être maintenu dans un équilibre stable. Ce théorème est démontré dans ce cas, puisque le jet chargé électriquement est, à un certain moment, dévié de sa trajectoire et adopte une trajectoire en forme de « lasso » ou de spirale dont le diamètre augmente brutalement : il s'agit de la zone d'instabilités électrostatiques. Cette instabilité est la conséquence directe de la répulsion électrostatique des charges électriques présentes à la surface du jet. L'instabilité du jet de polymère provoque l'étirage et l'affinement du filament jusqu'à un diamètre de quelques microns ou nanomètres (en conditions extrêmes). Ces instabilités permettent une accélération du jet favorisant sa solidification en laissant le temps au solvant de s'évaporer ou au polymère de refroidir.

Une fois solide, le filament se dépose sur le collecteur selon la forme d'un disque et de manière complètement aléatoire. Le matériau résultant est donc composé d'un unique filament entremêlé sur lui-même comme un textile non tissé (Figure 1-5 - B).

La taille et la morphologie des filaments peuvent être maîtrisées par l'ajustement d'un ensemble de paramètres qui sont souvent interdépendants. Dans cette partie ne seront exposés que les paramètres variables pour l'électrofilage par voie solvant. Les caractéristiques des filaments dépendent des propriétés de la solution, de l'appareillage et des conditions environnementales.

### Paramètres de la solution

Les propriétés de la solution ont une influence importante sur la morphologie des filaments obtenus. Ainsi, il est possible de la contrôler en ajustant par exemple la viscosité, la tension superficielle ou la conductivité électrique de la solution.

· Viscoélasticité de la solution

La viscoélasticité de la solution est sûrement le paramètre le plus important de l'électrofilage puisqu'il gouverne la « filabilité » d'une solution. Ce paramètre dépend de la nature du polymère en premier lieu mais aussi de son poids moléculaire et de sa concentration en solution [60]. Plus les chaînes de polymère sont longues et concentrées dans la solution, plus leur taux d'enchevêtrement, et donc la viscoélasticité de la solution, le seront aussi. En deçà d'un poids moléculaire et d'une concentration critique, la solution n'est pas assez élastique pour former un filament continu et se rompt sous forme de gouttelettes, ce cas correspond au procédé d'électrospray. Dans le cas où ces deux caractéristiques sont proches de leur valeur critique, le filament est discontinu et peut prendre la forme d'un filament perlé.

Une viscoélasticité suffisante est essentielle à la formation d'un filament, toutefois ce paramètre a une influence importante sur le diamètre du filament [61]. Plus la viscoélasticité est élevée, plus le diamètre du filament est important. L'intérêt principal de l'électrofilage étant de pouvoir produire des filaments très fins, il est donc intéressant d'utiliser des solutions de viscosités raisonnables pour produire des filaments uniformes et possédant un diamètre assez faible. C'est pourquoi de manière générale, l'électrofilage en voie solvant, qui permet d'utiliser des solutions plus fluides que la voie fondue, est souvent utilisé.

Ce paramètre sera traité plus en détail en Chapitre 2.

Tension superficielle de la solution

Comme déjà expliqué dans le principe du procédé d'électrofilage, la tension superficielle de la solution rentre aussi en compte dans la formation du filament. Pour rappel, un liquide à haute tension superficielle a une tendance plus forte à minimiser son interface et donc favoriser la formation de gouttes sphériques. Ainsi, dans le cadre de l'électrofilage, il sera plus facile de former du spray à partir d'une solution de tension superficielle élevée.

Plusieurs solutions existent pour contrecarrer ce phénomène. Il est par exemple possible d'augmenter la viscosité de la solution, d'ajouter un solvant comme l'éthanol à faible tension superficielle ou encore d'ajouter des tensio-actifs [62].

### Conductivité électrique de la solution

La conductivité électrique de la solution qui représente la quantité de charges électriques en solution, est un paramètre essentiel pour permettre la formation et l'étirage du filament. Comme expliqué précédemment, la présence de charges en surface du liquide provoque d'abord la déformation de la goutte en un cône puis lorsque la densité de ces charges est suffisamment importante, le filament est généré à partir de l'extrémité du cône. La quantité de charges en solution a aussi une influence sur le comportement du jet en vol puisque par répulsion électrostatique, le trajet du jet va subir des instabilités qui vont provoquer son étirage et donc la diminution de son diamètre. Dans les limites du possible, il est donc possible de faire varier le diamètre du filament en jouant sur la conductivité de la solution. Une solution plus conductrice permet aussi de faire de l'électrofilage à partir d'un champ électrique plus faible.

Il est possible d'augmenter la conductivité d'une solution par exemple en utilisant un solvant plus conducteur ou en ajoutant des molécules chargées comme des sels ou des polyélectrolytes [63].

Paramètres de l'appareillage

Les paramètres liés au procédé ont aussi une influence certaine sur les caractéristiques des filaments électrofilés. Les paramètres les plus significatifs sont la différence de potentiel appliquée entre l'aiguille et le collecteur, la distance qui les sépare, le débit de la solution dans le capillaire, ou encore le diamètre de l'aiguille.

Tension électrique

La tension électrique est le paramètre essentiel du procédé d'électrofilage. Pour une distance donnée entre l'aiguille et le collecteur (distance de travail), il est possible de relier la tension électrique au champ électrique suivant l'équation suivante :

$$E = \frac{V}{d}$$
 Equation 1

E représente la puissance du champ électrique (kV/cm), V représente la tension électrique (kV) et d représente la distance de travail (cm).

En électrofilage, le champ électrique induit doit être suffisamment élevé pour générer une quantité de charges suffisante au sein du liquide et ainsi déformer la goutte en un filament. Le jet de solution peut adopter différentes morphologies en fonction du champ électrique et du débit de solution. Pour un champ électrique plutôt faible, il est possible de générer des gouttes («jetting ») ou des microgouttes (« micro dripping ») en fonction du débit. Pour un champ électrique ensuite plus important, il est possible de générer un filament (« cone jet »). Si le champ électrique devient trop important, cela peut provoquer la déviation du jet (« tilted jet ») ou la production du plusieurs jets non contrôlés (« multi jet »).

Dans une gamme de tension électrique qui permet d'obtenir une morphologie « cone jet » et un « multi jet », la tension peut aussi avoir une influence sur le diamètre du filament obtenu. Une tension électrique plus importante aura tendance à étirer davantage le filament et donc former des filaments plus fins [64].

### ·Distance de travail

La distance de travail peut influencer deux paramètres différents. Elle peut d'abord faire varier la force du champ électrique. Effectivement, en augmentant la distance et donc l'espace entre l'aiguille et le collecteur qui sont chargés électriquement, la force du champ sera plus faible. De ce fait, à tension

électrique constante, la distance de travail peut affaiblir ou augmenter le champ électrique et ainsi faire varier le diamètre du filament. D'autre part, la variation de la distance de travail implique de manière logique la variation du temps de vol du jet de polymère avant d'arriver sur le collecteur. Cela peut alors être intéressant pour optimiser le séchage ou le refroidissement du filament avant qu'il n'atteigne le collecteur. Ce paramètre est important pour optimiser la forme du filament obtenu puisqu'un jet humide peut par exemple se déformer sous la force de l'impact sur le collecteur [65].

### ·Le débit de la solution

Le débit de la solution correspond au volume par unité de temps qui est extrudé à travers l'aiguille. Le débit doit être adapté au champ électrique appliqué. Pour qu'un filage soit stable, la quantité de matière étirée par le champ électrique doit être similaire à la quantité de matière extrudée. Si on augmente le débit de la solution alors que le filage est stable, le filament résultant sera plus épais, voire perlé [66]. Si le débit est au contraire insuffisant, le filage risque de s'interrompre. Le débit de solution peut aussi avoir une influence sur le diamètre du filament : un débit plus important permettra d'augmenter le diamètre du filament obtenu.

### •Diamètre de l'aiguille

Le diamètre interne de l'aiguille peut avoir une influence sur le diamètre du filament résultant [65]. Le diamètre de l'aiguille ne doit néanmoins pas être trop faible car cela engendrerait des pressions importantes au sein de l'aiguille, compte tenu de la viscosité des solutions utilisées.

### Conditions environnementales

Les conditions dans lesquelles se produit l'électrofilage ont, elles aussi, une influence sur l'électrofilage et la morphologie des filaments obtenus. La température et l'humidité de l'environnement de l'électrofilage sont des paramètres importants. Il est à noter que ces deux paramètres sont trop peu souvent pris en compte dans la littérature.

### Température

La température de l'environnement dans lequel l'électrofilage a lieu peut avoir plusieurs impacts sur le procédé. En estimant que la solution électrofilée est à la même température que son environnement, cette température peut avoir une influence sur la viscosité de la solution mais aussi sur la vitesse d'évaporation du solvant. D'une part en augmentant la température, il est alors possible de diminuer la viscosité et ainsi obtenir des filaments de taille plus réduite [67] et de morphologie plus uniforme [68]. D'autre part une augmentation de la température peut permettre d'augmenter la vitesse d'évaporation afin d'obtenir des filaments secs sur le collecteur.

### • Humidité

L'humidité de l'environnement dans lequel l'électrofilage a lieu peut aussi avoir une influence sur la vitesse d'évaporation de la solution et la morphologie des filaments. Il est par exemple possible d'augmenter la vitesse d'évaporation du solvant, si celui-ci est de l'eau, en appauvrissant l'environnement en vapeur d'eau. Dans le cas contraire, une humidité importante peut permettre d'éviter un séchage prématuré de la solution à la sortie de l'aiguille. La morphologie des filaments peut être impactée par une humidité importante dans le cas de l'électrofilage d'une solution volatile. Effectivement, il a été remarqué qu'une humidité au-delà d'environ 50% pouvait engendrer la formation de pores à la surface des filaments [69]. Cela a été expliqué par la condensation de l'eau sur le jet en cours de séchage. Il est aussi connu que l'humidité possède une influence sur la décharge électrique du jet de polymère. Plus l'humidité est importante, plus la décharge est importante [70].

Une humidité élevée nécessite donc d'utiliser des tensions électriques plus importantes pour compenser cette décharge.

> Modélisation du comportement du jet en électrofilage

Afin de prendre en compte le nombre important de paramètres (listés précédemment) qui rentre en compte dans la formation de filaments électrofilés, et prédire le comportement et la trajectoire du jet, plusieurs modèles numériques ont été proposés dans les années 2000 et sont depuis lors discutés et ajustés. Ces modèles peuvent être classés suivant deux catégories : les modèles qui décrivent le comportement du jet en le considérant comme un milieu et une masse continus (modèle A) [71], [72] et les modèles qui analysent le jet en le divisant en segments viscoélastiques rectilignes rattachés entre eux par deux masses ponctuelles chargées électriquement (modèle B) [73]–[75]. La division du jet en plusieurs segments introduit par le modèle B, a l'avantage de permettre l'analyse de l'évolution du jet lorsque sa trajectoire est déviée par les instabilités (partie instable du jet). En revanche, il a été montré que pour la modélisation de la partie stable du jet, les modèles A permettaient une meilleure description du comportement du jet (concordance entre données théoriques et expérimentales) [76].

Des modèles de plus en plus affinés et de plus en plus complexes sont aujourd'hui développés. L'objectif est évidemment de prendre en compte le plus de facteurs possibles qui ont une influence sur la formation et l'élongation du filament. Ces forces ont été schématisées dans l'article de Simko *et al.* [77] où un modèle B a été utilisé (Figure 1-6) :

• Force de champ électrique ( $F_E$ ) appliquée sur les charges électriques

• Force répulsive de coulomb (F<sub>c</sub>) appliquée sur les charges électriques entre elles

 $\cdot$  Force de tension de surface ou capillaire (Fs) du jet s'exerçant à la surface du jet

• Forces viscoélastiques (F<sub>M</sub>)

 $\cdot$  Force de résistance à l'air ( $F_{\text{D}}$ ) (négligé la plupart du temps)

• Force de gravité (négligé la plupart du temps)

Dans la plupart des modèles, ces forces sont décrites directement ou indirectement par un ensemble de nombre sans dimension. Ces nombres sans dimension sont souvent utilisés en mécanique des fluides ou pour décrire des phénomènes de transfert. Ils présentent l'avantage de pouvoir comparer des systèmes différents entre eux. Dans le cas de l'électrofilage, l'utilisation de nombre sans dimension permet par exemple de s'affranchir des paramètres variables comme la distance de travail ou la taille de l'aiguille. C'est pourquoi ils ont un intérêt particulier dans l'élaboration de modèle numérique et la compréhension du comportement du jet. Parmi eux, les nombres sans dimension les plus utilisés pour modéliser le jet en électrofilage sont listés dans le Tableau 1-3.





## Tableau 1-3 Liste non exhaustive des nombres sans dimension souvent utilisés dans les modèles numériques d'électrofilage.

Nombre sans dimension	Paramètres comparés
Reynolds (Re)	Forces d'inertie / forces de viscosité
Deborah (De)	Temps de relaxation / temps de l'expérience
Capillaire (Ca)	Forces de viscosité / tension superficielle
Hooke (Ho)	Forces d'inertie / forces élastiques
Weber (We)	Forces d'inertie / tension superficielles

Ces modèles ont permis de modéliser des paramètres intéressants pour l'électrofilage comme l'évolution du diamètre du jet ou la trajectoire en trois dimensions des instabilités du jet dans la partie instable [77]. L'évaporation du solvant est aussi, certaines fois, prise en compte dans la solidification du jet lorsque ce dernier présente une trajectoire instable [74]. En revanche, ce phénomène est souvent négligé dans la partie stable du jet.

### 2.1.3 Application de l'électrofilage conventionnel à l'ingénierie tissulaire

L'électrofilage est très apprécié pour produire des structures pour l'IT. La structure des matériaux obtenue, constituée de filaments nanométriques entremêlés de manière totalement désordonnée, est en effet similaire au réseau de nanofibres protéiques d'une MEC. Cette ressemblance est plutôt avantageuse puisque, pour rappel, la stratégie de régénération de l'IT est de reproduire l'environnement dans lequel évoluent naturellement les cellules, la MEC. D'autre part, les structures électrofilées sont aussi très intéressantes pour leurs propriétés physiques et biologiques listées ciaprès.

### > Bioactivité

Il est assez simple de rendre une structure électrofilée bioactive. Il est possible d'intégrer des agents bioactifs suivant deux différentes stratégies [78] (Figure 1-7). Une première stratégie consiste à fixer les agents sur les filaments déjà élaborés soit par adsorption soit par traitement chimique. Les autres stratégies consistent sinon à intégrer les agents bioactifs dans la solution de polymère avant la mise en forme. L'intégration d'agents bioactifs dans la solution peut s'effectuer suivant une technique dite de « blend-electrospinning » pour laquelle l'agent est mélangé dans la solution de polymère biodégradable [79][80] ou une technique de coextrusion dans laquelle l'agent est isolé du polymère biodégradable en étant introduit dans une solution aqueuse de polymère plus hydrophile placée au cœur du filament [81]. Cette dernière technique consiste à utiliser des buses concentriques alimentées par la solution de polymère biodégradable et la solution de polymère hydrophile. Ce procédé donne naissance à des structures originales en forme de câbles ou de tubes [82]–[85]. Ces techniques seront expliquées plus en détail dans le Chapitre 4. Les secondes stratégies qui consistent à intégrer les agents bioactifs au sein du filament, ne concernent que l'électrofilage voie solvant. La voie fondue ne peut pas être utilisé car les températures élevées peuvent endommager les agents bioactifs à intégrer dans les filaments.



*Figure 1-7 Schéma des différentes stratégies pour rendre un filament électrofilé bioactif. Sont exposées les techniques par adsorption (a), par mélange (b), par coextrusion (c) et par traitement chimique (d)* [9]

#### > Matériaux

La condition la plus importante de « filabilité » d'un matériau étant ses propriétés viscoélastiques, un grand nombre de matériaux polymères peut être utilisé en électrofilage. Il est aussi possible d'électrofiler des matériaux polymères composites en ajoutant des molécules aux propriétés spécifiques dans la solution : molécules fluorescentes [86], des principes actifs ou précurseurs [87]. L'électrofilage offre la possibilité d'élaborer des filaments inorganiques céramiques [87]. Ils peuvent être obtenus après traitement thermique de matériaux polymères électrofilés (filaments contenant des précurseurs ou des particules).

Architecture

L'architecture entremêlée de ces filaments nanométriques possède certains avantages pour l'IT. Les filaments, présentant un diamètre de faible dimension, possèdent un rapport surface sur volume très important [88]. Cette grande surface d'échange permet alors d'augmenter les interactions avec le milieu biologique environnant en favorisant par exemple l'absorption de protéines ou l'adhésion des membranes cellulaires [89]. De plus, les propriétés mécaniques d'un filament électrofilé se sont révélées aussi particulièrement importantes. Le fait d'étirer un jet de polymère permet d'aligner les chaînes de polymère au sein du filament et donc de limiter sa capacité à s'étirer dans le sens de sa longueur [90]. Dans l'étude de S.-Y. Gu *et al.* 2005 [90], il a par exemple été démontré que plus la tension électrique appliquée est importante, plus le module de Young du filament est élevé. Ainsi pour une tension de 22 kV à une distance de travail de 22 cm, un mat de filaments de polyacétonitrile avec un module d'environ 26 GPa a été obtenu. En comparaison, le module de Young d'un film fondu de polyacétonitrile n'est seulement que de 1,18 GPa.

L'architecture des structures obtenues par électrofilage possède donc plusieurs avantages pour l'IT. Néanmoins, plusieurs autres caractéristiques limitent l'utilisation de ces structures pour la régénération tissulaire. L'électrofilage permet par exemple d'obtenir un matériau non-tissé dont le taux de porosité moyen est élevé, de l'ordre de 60 à 80% en volume. Cependant la taille des pores, définie par la distance entre les filaments, n'est souvent pas suffisante pour permettre une prolifération efficace des cellules au sein de la structure. La culture cellulaire réalisée sur un mat de filament est donc souvent limité au 2D. De plus, la trajectoire du jet soumis à des instabilités ne permet pas de contrôler la localisation du dépôt de filament, ce qui empêche le contrôle de la morphologie des pores de la structure (ou très difficilement).

L'électrofilage est à priori une technique adaptée pour l'IT puisqu'elle permet de facilement intégrer des molécules bioactives et elle s'applique pour un grand nombre de matériaux polymères. Les filaments obtenus possèdent de plus des propriétés mécaniques intéressantes et interagissent bien avec les milieux biologiques. Néanmoins, la taille et la morphologie des pores des structures électrofilées sont limitées ce qui ne permet pas d'optimiser de manière efficace la prolifération cellulaire nécessaire à la régénération d'un tissu. Cette limite est, depuis peu, en train de disparaître grâce à la nouvelle technique d'électro-impression qui est capable de localiser de manière précise le dépôt des filaments et qui fait, ici, l'objet de ce travail de thèse.

### 2.2 Techniques émergentes d'électro-impression

Devant le potentiel que représente ces techniques pouvant être assimilées à une nouvelle catégorie de FA ultra-résolue, de nombreuses études se sont mises en place pour développer la technologie. La stéréolithagraphie deux-photons étant jusqu'alors la seule technique de FA ultra-résolue, l'électroimpression permettrait d'étendre les possibilités de géométrie de la FA.

De nombreuses études ont alors été menées pour contrôler de manière de plus en plus précise le dépôt du filament en électrofilage. Cela a d'abord débuté par le contrôle de l'orientation des filaments dans les années 2000 [91] qui s'est révélé intéressant pour l'IT car les filaments alignés permettent d'orienter la migration et la forme des cellules [92]. Pour obtenir ce type de matériaux, plusieurs stratégies ont été utilisées comme l'alignement par entrainement mécanique (collecteur cylindrique rotatif [93]) ou par modulation du champ électrique (collecteur composé de plusieurs électrodes [94]).



Figure 1-8 Schéma des systèmes d'électrofilages champ lointain et champ proche utilisés en électro-impression.

L'apparition du procédé d'électro-impression peut être assimilée à l'année 2006 avec la publication introduisant l'électrofilage en champ proche : « Near-field electrospinning » [95]. L'électrofilage champ proche désigne un système d'électrofilage dont la distance entre l'aiguille et le collecteur a été réduite à quelques millimètres (Figure 1-8). Ce montage permet de s'affranchir des instabilités que subit la trajectoire du jet et, qui apparaissent généralement au bout de quelques centimètres de la pointe de l'aiguille en champ lointain. C'est en couplant ce jet stable en champ proche avec un déplacement relatif entre l'aiguille et le collecteur qu'il est alors possible de localiser et diriger le dépôt du filament. C'est ce qui caractérise la technique d'électro-impression.

### 2.2.1 Paramètres importants du procédé

Mise à part la vitesse de déplacement du collecteur, les paramètres à optimiser pour l'électroimpression sont les mêmes que pour l'électrofilage conventionnel : propriétés de la solution, paramètres d'électrofilage (tension électrique, débit de matière extrudé, distance de travail, diamètre de l'aiguille), paramètres environnementaux (température et humidité). L'influence de ces paramètres sur la filabilité, la taille et la morphologie des filaments en champ lointain sont similaires en champ proche. Une viscosité et une distance de travail plus élevées en champ proche ont par exemple tendance à mener à des filaments de diamètre plus important comme en champ lointain [96]. Parmi ces paramètres, la vitesse de déplacement du collecteur est particulièrement importante pour l'électro-impression.

Vitesse de déplacement du collecteur

Le mouvement relatif entre le collecteur et la pointe de l'aiguille permet de diriger le dépôt du filament. Comme pour toute technique d'écriture, ce mouvement a donc d'abord un rôle important dans la précision de localisation du filament : plus la précision de déplacement sera importante, plus le dépôt sera précis aussi. La vitesse de déplacement a de plus une influence sur le motif que peut former le filament lorsqu'il se dépose. Si la vitesse du filament (V<sub>f</sub>) en vol est plus importante que la vitesse de déplacement du collecteur (V<sub>c</sub>), alors le filament va former des boucles en se déposant. Au contraire, si la vitesse du filament est égale ou supérieure à la vitesse de déplacement, le filament sera étiré et se déposera suivant une ligne (Figure 1-9)[97].



*Figure 1-9 Influence de la vitesse de déplacement du collecteur sur les motifs qu'adoptent les filaments déposés* (1), sur le diamètre du filament (2) [97] et sur la précision de localisation du filament [98].

Lorsque la vitesse du collecteur dépasse la vitesse du jet  $(V_c>V_f)$ , le collecteur va entrainer mécaniquement le filament. Celui-ci sera donc étiré sous l'influence du champ électrique et de l'entrainement mécanique du collecteur. C'est pourquoi, une vitesse Vc élevée au-dessus du seuil V<sub>c</sub>>V<sub>f</sub> aura tendance à réduire le diamètre du filament (Figure 1-9 - 1 et 2)[97]. Il a aussi été montré qu'une vitesse V<sub>c</sub>>V<sub>f</sub> a tendance à réduire la précision de localisation du jet de polymère en induisant un décalage entre le motif de déplacement et le dépôt du filament (Figure 1-9 - 3) [98].

Le lien entre le motif déposé et la vitesse de déplacement du collecteur doit être soigneusement pris en compte pour la conception des structures. Il est important de prendre en compte chaque changement de direction ou les déplacements décrivant des lignes courbes qui peuvent engendrer une décélération du collecteur et donc l'apparition de filaments bouclés.

La vitesse du filament en vol est influencée par les propriétés de la solution ou du matériau fondu (conductivité, viscoélasticité) mais surtout par la force du champ électrique (tension et distance de travail). Plus la force du champ électrique est importante, plus le filament est étiré et donc accéléré. La vitesse de déplacement du collecteur doit donc être accordée en fonction des propriétés de la solution ou du matériau fondu, la tension et la distance de travail.

Solidification du filament par évaporation du solvant ou refroidissement

La solidification du filament en vol est à prendre en compte autant en électrofilage conventionnel qu'en électro-impression. En électrofilage conventionnel, la solidification du filament par évaporation du solvant (voie solvant) ou par refroidissement (voie fondue) se fait essentiellement lorsque le jet adopte une trajectoire en lasso. En l'absence de zone instable en électro-impression, la solidification doit se faire beaucoup plus rapidement. Cela n'a pas vraiment posé de problèmes en électroimpression voie fondue car les matériaux utilisés sont déjà suffisamment visqueux pour permettre une solidification rapide. Néanmoins, la voie solvant a dû s'adapter pour augmenter la vitesse de solidification du jet. Pour cela, des solutions concentrées de polymère comportant des solvants volatiles sont généralement utilisées. Dans l'étude de Wu et al. [99] par exemple, des solutions de Poly (caprolactone) (PCL) à 70% dans de l'acide acétique ont été utilisées pour de l'électro-impression voie solvant.

Il est, de plus, intéressant d'optimiser les paramètres de séchage ou de refroidissement afin de consolider les structures. Dans le cas où des parois sont par exemple formées, il est intéressant d'utiliser des filaments qui ne sont pas entièrement secs ou solides afin que les couches superposés puissent adhérer ou se coller entre elles.

### 2.2.2 Structures produites par électro-impression pour l'IT

C'est en 2011 que l'équipe de Dalton *et al.* [97] publie pour la première fois une étude démontrant la possibilité d'obtenir des structures en électrofilage voie fondue par superposition de filament couche par couche. C'est à partir de cette étude que l'engouement pour l'électro-impression pour l'IT a décollé et que le nombre d'études s'est multiplié.

> Géométrie

Différentes géométries ont pu être développées en électro-impression comme des murs, des grilles, ou des lignes courbées [97], [100], [101] (Figure 1-10).

Les structures en forme de grille sont le plus souvent étudiées car elles sont formées par superposition de filaments déposés de manière rectiligne. Les cultures cellulaire réalisées sur ces structures ont montré que les cellules adhéraient très bien à la surface des filaments et que leur migration se faisait en trois-dimensions, contrairement à ce qui avait été observé sur des cultures cellulaire faites sur mat électrofilé de faible porosité [102]. Les géométries ont pu être adaptées en fonction des tissus à régénérer. Pour la régénération de tendons par exemple, des structures en forme de grille avec des pores rectangulaires ont été produites [99]. Deux diamètres différents de filaments ont été produits pour assurer une tenue mécanique à la structure et favoriser l'adhésion cellulaire. La structure enroulée post-fabrication, forme un tube similaire à l'architecture d'un tendon (Figure 1-10). Le test in vitro a montré que les pores de forme rectangulaire orientés dans l'axe du tube ont permis d'allonger la forme des cellules selon cet axe. De plus, la structure a permis de favoriser l'expression de collagène type I des cellules. Une autre géométrie originale a été utilisée pour la régénération du ménisque du genou [103]. La structure est composée de 300 couches disposées en arcs de cercle concentriques et entrecroisées par des couches radiales (Figure 1-10). La structure a été testée in vitro avec des cellules souches mésenchymateuses et a montré une faible cytotoxicité. Une production de protéines de la MEC par les cellules a aussi été observée (sGAG, collagène type I et II).

L'équipe de Hochleitner *et al.* [104] a aussi mis en évidence l'intérêt d'utiliser des filaments formant des motifs bouclés qui ont été produits avec des vitesses de déplacement inférieures à la vitesse du filament (Figure 1-10). Ces motifs de filaments ont permis de moduler les propriétés mécaniques des structures résultantes pour se rapprocher des propriétés mécaniques de tissus ligamentaires et de tendons. Aucun test in vitro n'a été réalisé mais l'auteur suppose que ces structures pourraient être prometteuses pour la régénération de ces tissus.



Figure 1-10 Images des différentes géométries obtenues en électro-impression. (a)(b) Grille faites en voie solvant à partir de solution de PCL/PVP [105]. (c) Structure en arc de cercle faite en voie solvant à partir de solution de PCL pour la régénération du ménisque du genou [103]. (e)(f) Structure en forme de tube faite en voie solvant à partir de solution de PCL pour la régénération de tendons [99]. (d) Filaments formant des motifs ondulés faits par voie fondue de poly(L-lactide-co-e-caprolactone-co-acryloyl carbonate) [104].

L'électro-impression a déjà permis de produire plusieurs géométries intéressantes pour l'IT mais il existe encore des limites technologiques qui empêchent d'élargir les possibilités. Il est par exemple difficile à ce jour d'obtenir des lignes de filaments avec un grand degré de courbure. Si on exclut bien entendu les courbes obtenues avec des filaments bouclés ou ondulés, il est difficile de maintenir une vitesse de collecteur suffisamment élevée sur des déplacements courbes. Il est aussi difficile d'obtenir des structures 3D composées de filaments nanométriques comme on pourrait les obtenir en

électrofilage champ lointain. Les diamètres de filaments obtenus en électro-impression sont généralement autour de 10  $\mu$ m. Ce décalage est, d'une part, dû à la viscosité élevée des matériaux utilisés pour obtenir des filaments solides en champ proche. D'autre part, l'absence d'instabilités ne permet pas d'étirer autant le filament qu'en champ lointain. Une étude a tout de même montré qu'il était possible d'obtenir des structures en grille composées de filaments de 800 nm de diamètre en voie fondue grâce à l'optimisation de la taille de l'aiguille, le débit extrudé, la tension et la distance de travail [102]. La structure étant sûrement très fragile, elle n'a pas été décollée de son support.

Une autre contrainte rencontrée en électro-impression est la hauteur limitée des structures produites. Une étude récente a montré les différents défauts qu'il été possible d'obtenir en électro-impression voie fondue au-delà d'une certaine hauteur de structure [106]. Ces défauts ont été reliés à différents phénomènes comme l'accumulation de charges électriques dans les filaments et l'évolution du champ électrique en cours d'impression. Le phénomène d'accumulation de charges en électrofilage est déjà assez connu [70]. Ces charges électriques localisées à la surface du filament sont facilement évacuées lorsque le filament atteint le collecteur. Néanmoins, le matériau déposé étant souvent isolant, le transfert des charges devient de plus en plus difficile au fur et à mesure que la structure prend de la hauteur. Ainsi au-delà d'un certain seuil, le filament qui se dépose étant encore chargé électriquement sera repoussé par les couches précédentes qui n'ont pas pu se décharger. C'est pourquoi, des défauts d'empilement des filaments peuvent apparaître. Aussi, lorsque la structure atteint des hauteurs dont l'ordre de grandeur est proche de celle de la distance de travail, la morphologie des filaments peut évoluer et induire des défauts dans la structure. En effet, à partir d'une certaine hauteur de structure, le filament déposé parcourt une distance plus faible que la distance de travail et ne peut donc pas être étiré de la même façon que ceux des premières couches. Afin d'éviter ce phénomène, l'équipe de Wunner et al. [106] a montré qu'il était possible d'atteindre des structures de 7 mm de hauteur en voie fondue en ajustant le champ électrique au cours de l'impression : la distance de travail et la tension ont été augmentées.

### Matériaux

Le matériau le plus couramment utilisé en électro-impression est le PCL autant pour la voie fondue que pour la voie solvant. Il est utilisé pour ses propriétés mécaniques assez élevées et pour sa grande filabilité sous champ électrique. Il peut être filé à des températures relativement faibles (80°C) ou dissous dans différents solvant : organique ou aqueux comme l'acide acétique [101],[107].

Afin de promouvoir la régénération des os, des matériaux hybrides ont aussi été utilisés. Une structure très fibreuse a par exemple été produite à partir d'une solution de PCL et de phosphate tricalcique (TCP) jusqu'à une fraction de 70% [108]. Des filaments poreux comportant une importante rugosité de surface ont été obtenus en collectant les filaments dans de l'éthanol. Ces structures se sont révélées intéressantes puisque la culture de préostéoblastes de souris a montré une forte activité cellulaire avec une adhésion, une prolifération et une différenciation cellulaire importantes. Pour le même type d'application, des structures en PCL contenant des particules d'hydroxyapatite ont aussi été produites en voie fondue [109]. La culture cellulaire faite à partir d'une lignée ostéaoblastique MC3T3-E1 a aussi montré que la structure composite favorisait la prolifération et orientait la forme des cellules.

Récemment, une autre étude a montré qu'il était possible d'intégrer des molécules bioactives dans des structures élaborées en électro-impression [105]. Dans ce cas, du chlorhydrate de tétracycline connu pour son action anti-inflammatoire et antibactérienne a été introduit dans une solution mélangeant du PCL et du poly (vinyl pyrrolidone) (PVP) et de l'acide acétique. La structure n'a pas été testée en culture cellulaire mais la cinétique de libération de la molécule a été étudiée en fonction de sa concentration et de la fraction de polymère PCL/PVP. Le caractère plus hydrophile du PVP a permis

de libérer une quantité plus importante de molécule bioactive à partir des structures PCL/PVP (mPCL/mPVP = 2/1) par rapport à des structures de PCL seul.

Des structures cellularisées ont aussi pu être produites en électro-impression à partir de filaments d'hydrogel contenant des cellules vivantes [110]. Le matériau extrudé avec les cellules était de l'alginate qui, une fois sur le collecteur, a été réticulé grâce à un aérosol de CaCl<sub>2</sub>. Dans ce cas, l'étude a montré l'influence du courant électrique appliqué sur la viabilité des cellules. Celui-ci doit être le plus bas possible pour maintenir une viabilité importante. Cela a été réussi puisqu'environ 87% de viabilité a pu être maintenue 4 heures après l'impression. Malheureusement, les propriétés de l'hydrogel n'ont pas permis de produire des structures de plus de 4 couches superposées.

### 3. Conclusion

Les techniques d'électro-impression sont en plein développement et déjà un nombre important d'études montre qu'il est possible de produire des structures intéressantes pour la régénération tissulaire (Tableau 1-4).

Le succès de cette technique est en partie lié aux travaux fournis par l'équipe de Dalton *et al.* qui s'est investi de manière intensive sur le développement de l'électro-impression en voie fondue. Elle a notamment pu mettre en évidence la possibilité de produire des structures de 7 mm d'épaisseur [106] ou des structures composées de filaments très fins de 800 nm de diamètre [102]. Le contrôle et les connaissances acquises sur la voie fondue ont permis à plusieurs industriels de développer des appareils et les proposer sur le marché. Parmi eux, il existe Regen HU, GeSIM et Spraybase. Il n'existe, en revanche pas encore d'appareil commercial qui permet d'utiliser l'électro-impression voie solvant.

Selon une revue de 2011 [97], les trajectoires des jets produits en électro-impression voie solvant seraient moins stables à cause de la conductivité plus élevée du solvant et de la viscosité plus faible des solutions. Cela n'a jamais été prouvé mais, en effet, il paraitrait cohérent que l'apport de solvant diminue la viscosité du polymère et permet d'augmenter la mobilité des charges électriques (conductivité) ce qui les rend les solutions particulièrement sensibles au champ électrique. Les longueurs de jet stable obtenues (avant l'apparition d'instabilités électrostatiques) sont alors généralement plus faibles. La partie stable du jet peut même disparaître si des molécules chargées comme des sels sont ajoutés en solution. Ces comportements réduisent donc drastiquement l'utilisation de solutions en électro-impression. De plus, les hauteurs de structures atteintes en voie solvant sont plus faibles que la voie fondue (Tableau 1-4). Des structures de plusieurs millimètres de haut peuvent être produites à partir de polymère fondu alors que des structures produites à partir de solution ne dépassent pas une centaine de micromètres de haut. Cette différence de comportement est aussi certainement liée aux différences de conductivité des matériaux.

L'électro-impression voie solvant offre pourtant des possibilités que la voie fondue ne permet pas, notamment en terme de bioactivité. Il est, en effet, assez simple d'intégrer des agents bioactifs comme des protéines dans les filaments en voie solvant contrairement à la voie fondue. Les avantages que peut offrir le dépôt localisé en voie solvant a alors mené ce travail de thèse à se concentrer sur le développement de cette technique. Comme précédemment expliqué, cela s'est d'abord traduit par l'étude de la stabilisation du jet sous champ électrique à partir des propriétés viscoélastiques des solutions de polymère puis par l'étude des phénomènes associés au dépôt localisé en champ proche en fonction de la hauteur des structures. L'objectif est de pouvoir, respectivement, augmenter le nombre de matériaux utilisé en électro-impression voie solvant et de pouvoir augmenter la hauteur des structures produites. De plus, dans le but de développer l'utilisation de l'électro-impression pour l'IT, une autre partie s'est consacrée à l'étude de l'influence de l'électrofilage sur la structure secondaire d'une protéine afin de la protéger. Des structures ont ensuite été étudiées pour la régénération hépatique et parodontale.

Référence	Voie	Polymère	Distance de travail (mm)	Extrusion	Diamètre de filament (µm)	Interligne filament (μm)	Hauteur de structure	Bioactivité	Culture- cellulaire
[100]	Fondue	PCL	£	10 µL/h	10	100 et 250	environ 20 couches		Lignée MC3T3- E1
[102]	Fondue	PCL	1,5	0,5-4 bars	0,8	100	50 couches		Cellules mésenchy mateuses stromales
[106]	Fondue	PCL	8 - 18		20	1000	7 mm		
[66]	Solvant (Ac. Acétique)	PCL	£	0,36-0,06 mL/h	75 et 20	600 et 1000	environ 500 µm		Cellules tenocytes humaines
[101]	Solvant (Ac. Acétique)	PCL	2	200 kPa	20	500	50 couches	polydopa mine	Cellules chondroc ytes porcines
[103][111]	Solvant (Ac. Acétique)	PCL	2	200 kPa	19	300 et 450	20 couches	hydrolyse de la surface avec NaOH	Lignée MC3T3-E1
[105]	Solvant (Ac. Acétique)	PCL/PVP	2	0,4 mL/h	11	200 et 500		chlorhydrate de tétracycline	
[108]	Solvant (Chlorure de méthylène/ diméthylfor mamide)	PCL	15	0,2 mL/h	342	459		tri-calcium phosphate	Lignée MC3T3-E1
[109]	Fondue	PCL	m	10 µL/h	6	100	20 couches	Particules d'hydroxy apatite	Lignée MC3T3-E1
[112]	solvent (Eau)	alginate	0,1	70 kPa	82		4 couches	Fibroblaste	Cellules fibroblaste

Tableau 1-4 Liste non exhaustive des structures produites en électro-impression pour l'IT et leurs caractéristiques.

Chapitre 2 Etude du comportement et des propriétés

# viscoélastiques du jet en électrofilage

# champ lointain

### 1. Contexte et objectifs

La trajectoire du jet en électrofilage est caractéristique de la technique. Sous l'action du champ électrique, la solution délivrée à la pointe de l'aiguille prend la forme d'un cône à partir duquel le jet se forme. Le jet adopte ensuite une trajectoire rectiligne sur plusieurs millimètres ou centimètres jusqu'à ce que des instabilités électrostatiques perturbent sa trajectoire. Le jet est alors dévié et adopte une trajectoire en forme de lasso (Figure 2-1). Dans la littérature, le terme « instabilité » peut être associé à différents phénomènes en électrofilage comme la formation de filaments perlés. Dans le cadre de cette étude, les instabilités traitées correspondent aux instabilités électrostatiques qui provoquent la formation d'un lasso.

La formation et le comportement du jet en électrofilage voie solvant est un processus complexe dans lequel un nombre important de paramètres intervient. Une étude du groupe de recherche de Renecker avait, par exemple, cité 13 paramètres pouvant influencer le diamètre final du filament électrofilé [61]. Le comportement du jet pour contrôler le diamètre ou la morphologie des filaments a beaucoup été étudié par ce groupe de recherche dans les années 2000 d'un point de vue théorique mais aussi expérimental [71], [73], [74], [113], [114]. Les forces les plus dominantes qui agissent sur le jet sont les forces viscoélastiques, les forces de tension de surface et les forces électrostatiques [77]. Les forces viscoélastiques et de tensions de surface ont tendance à limiter l'apparition d'instabilités du jet alors que les forces électrostatiques ont tendance à les amplifier. D'un point de vue expérimental, ces tendances n'ont été que très peu étudiées. A ma connaissance, seules deux études existent sur la mise en évidence du lien entre viscoélasticité des solutions de polymère et la trajectoire du jet en électrofilage [115] [116]. Il a notamment été montré la possibilité d'obtenir des longueurs de jet stable plus importante et donc moins d'instabilités en augmentant la masse molaire du polymère ou la concentration de la solution. Une autre étude de 2008 a aussi montré le lien entre la force électrostatique et notamment la quantité de charges électriques en surface du jet avec sa trajectoire [117]. Dans ce cas, la quantité de charge à la surface du jet a été réduite par l'injection d'un gaz ionisé ce qui a permis la stabilisation du jet. Aucune étude expérimentale n'a été trouvée sur le lien entre les forces de tensions de surface et la trajectoire du jet.



*Figure 2-1 Montage d'électrofilage et comportement du jet de polymère sous champ électrique.* 

Au vu de l'utilisation exponentielle du dépôt localisé de jet stable sous champ électrique (électroimpression), l'intérêt du contrôle de la trajectoire du jet devient grandissant. Jusqu'à présent, seules des formulations assez simples polymère-solvant ont été utilisées, pour lesquelles des jets stables de plusieurs millimètres ou centimètres sont généralement obtenus. Néanmoins, lorsque les formulations deviennent plus complexes avec l'introduction d'excipients qui peuvent être sensibles au champ électrique (nano- ou microparticules, sels, protéines), le jet stable peut diminuer voire même disparaître. De telles formulations sont alors inutilisables en électro-impression. Afin de pouvoir diversifier et complexifier les matériaux utilisés en électro-impression, une partie de cette thèse s'est alors consacrée à l'étude de la stabilité du jet en fonction des propriétés viscoélastiques des solutions de polymères. Parmi les trois paramètres ayant une influence sur le comportement du jet, la viscoélasticité a été étudiée car des effets intéressants sur la stabilité du jet ont déjà été démontrés expérimentalement. De plus, l'ajustement de l'élasticité des solutions peut s'effectuer de manière assez simple en modifiant la concentration du polymère ou sa masse molaire, par exemple.

Trois polymères et deux solvants ont été utilisés pour cette étude. Les polymères sont le poly(oxyde d'éthylène) (PEO), l'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) (85% de monomère lactique et 15% de glycolique) et le poly(caprolactone) (PCL). Le PEO est un polymère déjà très étudié dans le cadre de l'électrofilage et est apprécié pour sa grande filabilité. Le PEO présente aussi l'avantage d'être soluble dans plusieurs solvants organiques, et dans l'eau. Trois masses molaires de PEO ont été utilisées dans de l'eau. Le PLGA et le PCL sont des polyesters résorbables qui comportent des propriétés intéressantes pour l'ingénierie tissulaire. Le PLGA est par exemple souvent utilisé pour développer des systèmes de délivrance de médicaments notamment grâce à son taux de dégradation ajustable en fonction de la proportion en monomère d'acide lactique et glycolique [118]. Le PCL fondu est très utilisé en électro-impression pour ses propriétés mécaniques et sa stabilité au filage [119]. Trois masses molaires ont été utilisées pour le PLGA et une seule pour le PCL. L'ensemble de ces quatre polymères a été dissous dans un solvant organique, l'hexafluoroisopropanol (HFIP). Ce solvant a été choisi car, selon le registre présenté par le CNRS en 2018, il n'est pas désigné comme composé CMR (Cancérogène, Mutagène et Reprotoxique).

Cette étude s'est déroulée en deux temps. Dans une première partie, la stabilité du jet en électrofilage caractérisée par la longueur de jet stable (LJS) a d'abord été comparée aux propriétés viscoélastiques des solutions utilisées. Les propriétés viscoélastiques ont été caractérisées par les paramètres de viscosité au plateau newtonien  $\eta_0$  et de temps de relaxation  $\lambda$  témoin de l'élasticité de la solution. En complément, la morphologie des matériaux déposés sous champ électrique a aussi été caractérisée. A partir de ces données, des équations de tendances ont été établies reliant les propriétés viscoélastiques à la concentration du polymère.

Dans une seconde partie, l'évolution de la viscoélasticité du jet a été étudiée au cours de son étirage. En électrofilage voie solvant, l'évolution des propriétés du jet est gouvernée par l'évolution du flux d'évaporation du solvant. Ce paramètre est souvent négligé dans les études expérimentales mais en fonction de la volatilité du solvant il peut avoir un effet important sur l'évolution des propriétés du jet et donc son comportement. Le flux d'évaporation du solvant au cours de l'étirage du jet a donc été étudié. Celui-ci a été estimé à partir de la mesure des valeurs de diamètre et de vitesse du jet. In-fine, l'idée serait de déterminer l'évolution de la concentration du jet à partir du flux d'évaporation et ainsi l'évolution de la viscoélasticité à partir des équations de tendance établies en première partie.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1 Composés et solutions

Les poly(oxyde d'éthylène) (PEO) de M<sub>w</sub> 200 et 900 kDa ont été achetés chez Acrôs organics et le lot de M<sub>w</sub> > 5 000 000 a été acheté chez Alfa Aesar. Les copolymères (PLGA et PCL) de grade médical ont été achetés chez Corbion. Les trois échantillons d'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA), composé à 85% de fraction molaire en monomère acide lactique, possèdent une viscosité inhérente de 2,3, 3,1 et 6,0 dL/g alors que le poly(caprolactone) (PCL), se caractérise par une viscosité inhérente de 1,2 dL/g. Le solvant 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) a été acheté chez TCI. Les particules fluorescentes de polystyrène de 2  $\mu$ m de diamètre ont été achetées chez Fisher Scientific (Molecular Probes<sup>TM</sup>, FluoSpheres<sup>TM</sup>). L'huile minérale de faible viscosité a été achetée chez Sigma-Aldrich.

La masse molaire moyenne en masse M<sub>w</sub> des polymères a été analysée par chromatographie d'exclusion stérique (CES) couplée à un détecteur UV (mesure à 664 nm pour le PEO et 658 nm pour les autres) (Tableau 2-1). Les mesures ont été réalisées au Laboratoire Ingénierie des Matériaux Polymères (IMP) par Agnès Crepet. Les M<sub>w</sub> des PEO à 200 et 900 kDa ont finalement été mesurées à 180 ±1 kDa et 900 ±5 kDa. La M<sub>w</sub> du PEO de très haut poids moléculaire > 5 MDa n'a pu être précisée par CES car la colonne de chromatographie n'était pas adaptée. Les M<sub>w</sub> du PLGA de viscosité inhérente de 2,1, 3,1, et 6,0 dL/g sont respectivement de 410, 570 kDa et 1,6 MDa. La M<sub>w</sub> du PCL de viscosité inhérente de 1,2, est de 160 kDa. Pour cette étude, un ensemble de solution a été préparé pour chaque polymère suivant plusieurs gammes de concentration (Tableau 2-1).

	Solvant	Caractérisation fournisseur	Mw par CES	Indice de polydispersité	Gamme de concentration utilisée
		200 kDa	180 ±1 kDa	3,24 ±0,03	6.10 <sup>-4</sup> – 0,45 g/mL
PEO Eau DI	900 kDa	900 ±5 kDa	1,96 ±0,01	2.10 <sup>-4</sup> – 0,13 g/mL	
		> 5 MDa	Non déterminée	Non déterminé	7,5.10⁻⁵ – 0,05 g/mL
		2.3 dl/g	410 ±25 kDa	1,8 ±0,1	2.10 <sup>-3</sup> – 0,2 g/mL
PLGA		3.1 dl/g	570 ±34 kDa	1,8 ±0,1	5.10 <sup>-3</sup> – 0,12 g/mL
	HFIP	6.0 dl/g	1,6 ±0,1 MDa	2,0 ±0,2	1.10 <sup>-3</sup> – 0,05 g/mL
PCL		1.2 dl/g	160 ±10 kDa	1,6 ±0,1	5.10 <sup>-3</sup> – 0,35 g/mL

Table and O. A. Calastiana da	and the second state of th	a second	<b>`</b>
ι αριεατί 2-1 χριμτιρής αε	noivmere litilisees '	' aamme ae concentration litilisee et masse molaire aes noivm	Pres
	polymere atmoces i	r gamme de concentration atmoce et masse moran e des porym	C/ C0.

### 2.2 Essai d'électrofilage

Afin de pouvoir comparer les solutions entre elles, les essais d'électrofilage ont été réalisés dans des conditions similaires. La solution placée dans une seringue a été extrudée à travers une aiguille 21G longue de 12 cm selon un débit de 0,5 mL/h. Le diamètre interne et externe de l'aiguille est

respectivement de 0,5 et 0,8 mm. Chaque pointe d'aiguille a été préalablement polie afin d'obtenir une extrémité non biseautée, puis a été lavée à l'eau distillée et à l'acétone. La tension a été délivrée au niveau de l'aiguille grâce à une alimentation haute tension de polarité positive entre 3 et 12 kV. Un disque métallique recouvert de papier aluminium et relié à la masse électrique a été utilisé comme collecteur.

Tous les paramètres pouvant influencer la stabilité, le diamètre et la vitesse du jet ont été fixés, exceptée la valeur de la tension électrique. Ce paramètre ne peut pas être fixé comme les autres car il dépend des propriétés de la solution (viscoélasticité, tension de surface et conductivité). Afin de pouvoir s'affranchir de ce paramètre variable et pouvoir comparer le comportement au filage des solutions, des critères ont été choisis afin de retrouver des conditions de filage similaires et stables pour l'ensemble des solutions.



Figure 2-2 Différentes morphologies de la goutte obtenues à la pointe de l'aiguille en fonction de la tension électrique appliquée, les autres paramètres étant constants.

Afin de se trouver dans des conditions de filage stable, il est d'abord important que la totalité du volume de la solution extrudée à travers l'aiguille soit étirée sous l'influence du champ électrique. En se référant à la Figure 2-2, ce critère exclut les phases (1) et (2) dans lesquelles des gouttes de solution extrudée peuvent tomber par gravité car la force d'étirage n'est pas suffisante. La phase (5), obtenue pour des tensions élevées, est souvent assimilée à un filage non-stable dans le temps. Effectivement, pour des tensions élevées, la solution peut être « sur-consommée » car légèrement trop étirée par rapport au volume extrudé. Ainsi, le cône de Taylor peut rentrer légèrement dans l'aiguille et perturber le filage. Pour certaines solutions, la phase (5) peut correspondre à une phase de « multijet » où plusieurs jets instables sont initiés en même temps. Les phases (3) et (4) correspondent à des filages stables dans le temps. Dans le cas de la phase (3), le jet est étiré à partir d'une goutte formée à la sortie de l'aiguille. Dans le cas de la phase (4), le jet est directement étiré en sortie d'aiguille. Afin d'éviter tout phénomène d'évaporation qui pourrait avoir lieu avant le filage, la phase (4), dont la surface de contact entre la solution et l'air est minimisée par rapport à la phase (3), a été choisie pour chaque essai.

### 2.3 Analyse du comportement du jet en vol

L'analyse du comportement du jet en vol s'est effectuée en mesurant la longueur de jet stable (LJS) et l'évolution du diamètre du jet et de sa vitesse selon deux techniques.



Figure 2-3 Différents montages utilisés en électrofilage champ lointain. Montage (a) : systèmes utilisés pour la mesure de la LJS. Montage (b) : systèmes utilisés pour la mesure du diamètre et la vitesse du jet.

Mesure de la longueur de jet stable

Afin de caractériser la stabilité de la trajectoire du jet en vol, la longueur de jet stable (LJS) entre la pointe de l'aiguille et l'apparition de la première instabilité a été mesurée pour chaque condition de filage. Cette longueur LJS a été mesurée à l'aide d'un système composé de deux règles graduées, déportées et parallèles à l'axe du jet (Figure 2-3- Montage (a)). Avec un éclairage LED, la mesure a été réalisée à l'œil en se plaçant dans l'axe perpendiculaire au jet et aux règles. L'erreur sur la mesure a été estimée à ± 5 mm.

Mesure du diamètre du jet

La détermination de l'évolution du diamètre du jet a été effectuée par imagerie à partir d'une caméra rapide. Celle-ci a été déplacée le long de l'axe du jet. Un éclairage avec des LED a été utilisé pour visualiser le jet avec la caméra (Figure 2-3-(b)). Dans certaines conditions, deux jeux de lumières ont été disposés à 180° l'un de l'autre par rapport au jet. Une succession d'images a été acquise avec une résolution de 4  $\mu$ m sur un temps d'exposition de 2 ms. Les diamètres du jet de polymère ont ensuite été déterminés par analyse des niveaux de gris du logiciel Image J (Figure 2-4).



Figure 2-4 Schéma d'un exemple de traitement d'image d'un jet de polymère par analyse du niveau de gris à partir du logiciel Image J.

 $\geq$ Mesure de la vitesse du jet

Les mesures de vitesse de jet ont été réalisées en mesurant la vitesse de particules fluorescentes présentes au sein du jet de polymère. La vitesse des particules a été considérée égale à la vitesse du jet et uniforme sur toute sa section. Pour ces analyses, une solution de 2% de microparticules a été ajoutée dans les solutions de polymère selon une dilution par 200. Les mesures de vitesse de jet ont été réalisées selon deux techniques différentes, présentées ci-après.

### Mesure par « Particle Image Velocimetry » (PIV)

Ces mesures se sont déroulées au sein du LMI, à Villeurbanne. La vitesse du jet a pu être déterminée par visualisation de la fluorescence des microparticules intégrées dans la solution. Les particules de polystyrène ont été tracées dans le jet de polymère à l'aide de la caméra rapide et d'un éclairage laser adapté à la fluorescence des particules de 532 nm (Figure 2-3-(b)). En prenant en compte le temps d'exposition de l'acquisition d'une image (t<sub>exp</sub> = 2 ms) et la longueur de la traînée qu'a formé la particule (z<sub>1</sub>-z<sub>2</sub>), la vitesse des particules dans le jet stable a pu être déterminée suivant l'équation 1 (Figure 2-5).



jet de polymère

Figure 2-5 Schéma d'un exemple d'image utilisée pour la mesure de vitesse de jet par PIV.

### Mesure par Vélocimétrie Laser à effet Doppler (VLD)

La vitesse du jet a aussi été mesurée par la technique de vélocimétrie laser à effet Doppler (VLD). Cette étude a été réalisée au Laboratoire de Mécaniques des Fluides et d'Acoustique (LMFA, UMR 5509, Ecole Centrale de Lyon) en collaboration avec Mme. Nathalie Grosjean et M. Emmanuel Jondeau. La technique VLD permet de déterminer la vitesse de particules par interférométrie et en se basant sur le décalage de la fréquence d'une lumière diffusée par des particules en mouvement (effet Doppler). Ainsi lors des essais, les particules au sein du jet sont éclairées par un laser monochromatique et cohérent. La lumière réfléchie par les particules est ensuite détectée par un capteur photo-sensible situé sur le dispositif VLD. La fréquence de la lumière est ensuite analysée à partir d'un logiciel.



Figure 2-6 Montage d'électrofilage sous boîte en plexiglas avec un dispositif VLD et une caméra rapide pour la mesure du diamètre et de la vitesse du jet.

La Figure 2-6 montre le schéma du montage utilisé pour la mesure de la vitesse du jet par VLD. Le dispositif VLD intégrant les lasers cohérents et le capteur photo-sensible a été déplacé grâce à une crémaillère avec déplacement micrométrique sur l'axe reliant la pointe de l'aiguille au collecteur. Le dispositif est aussi placé sur deux platines de déplacement micrométrique X et Y. Ainsi les mesures de vitesse de jet ont été effectuées en fonction de la distance entre l'aiguille et le collecteur. Le dispositif VLD intègre deux couples de lasers cohérents, de longueur d'onde respective 488 nm et 514,5 nm, qui se croisent au niveau du point de mesure, le jet. Les lasers verts à 488 nm mesurent la vitesse des particules sur l'axe horizontal (ou longitudinal) qui correspond à l'axe reliant la pointe de l'aiguille au collecteur alors que les lasers bleus à 514,5 nm mesurent la vitesse des particules sur l'axe vertical (ou transversal) qui correspond à l'axe perpendiculaire au jet. Le volume d'analyse forme comme un ellipsoïde transverse au jet, dont les diamètres caractéristiques sont 50 et 800 µm. Au fur et à mesure que le laser est déplacé le long de l'axe du jet, le volume d'analyse est repositionné sur le jet grâce à un ajustement avec les platines de déplacement X et Y. Chaque analyse en un point donné est réalisée avec 200 000 mesures de vitesse.

### 2.4 Analyse viscoélastique des solutions de polymères

L'ensemble des analyses viscoélastiques des solutions de polymères ont été réalisées sur un rhéomètre à déformation imposée ARES G2 (TA) à 25°C au Laboratoire Ingénierie des Matériaux Polymères (IMP) en collaboration avec Pr. René Fulchiron. Pour les solutions de PEO dans l'eau, deux géométries ont été utilisées en fonction de leur sensibilité (Figure 2-7) : géométrie plan-parallèle pour les viscosités élevées (> 0,1 Pa.s) et une géométrie couette pour les viscosités plus faibles  $(1.10^{-3} - 4 \text{ Pa.s})$ .

Pour les solutions de PLGA et PCL dans l'HFIP, seule la géométrie couette a été utilisée. Le solvant HFIP étant très volatil et potentiellement nocif pour la santé, une couche d'huile de faible viscosité (2.10<sup>-2</sup> Pa.s) a été déposée à la surface de la solution placée dans le couette (Figure 2-7). Ainsi, les vapeurs de solvant et l'évolution des propriétés viscoélastiques durant l'analyse ont été évitées. La géométrie du plan-parallèle ne permettant pas l'utilisation d'huile, la gamme de viscosité analysée de ces solutions a été limitée à des viscosités plus faibles.



Figure 2-7 Géométries utilisées sur le rhéomètre AREG G2

Des analyses de viscoélasticité en régime dynamique (cisaillement de la géométrie) ont été effectuées à partir d'une viscosité d'environ 3.10<sup>-3</sup> Pa.s. En deçà de cette viscosité, les solutions présentent un comportement viscoélastique très faible proche d'un comportement newtonien. Sur ces solutions, seules des analyses de viscosité ont donc été effectuées en régime statique (rotation continue de la géométrie).

Courbes et modèles utilisés

Les analyses en régime statique ont permis d'obtenir des courbes de viscosité ( $\eta$ ) en fonction de la vitesse de rotation ( $\gamma$ ). Les analyses en régime dynamique ont permis d'obtenir les courbes de viscosité complexe  $|\eta^*|$  et les courbes des modules de conservation (G') et de perte (G'') déterminés à partir du module complexe G\* en fonction de la fréquence de cisaillement  $\omega$  (Figure 2-8).



Figure 2-8 Courbes obtenues des analyses viscoélastiques des solutions de polymères sur le rhéomètre ARES G2. (G' : symbole plein ; G'' : symbole vide)

Les courbes de viscosités  $\eta$  ou  $\eta^*$  décrivent d'abord un plateau newtonien à faible fréquence puis la viscosité diminue par effet rhéofluidifiant à plus forte fréquence. A partir de ces courbes, la valeur de viscosité au plateau newtonien  $\eta_0$  a pu être déterminée. Sur cette gamme de fréquence, les graphiques de G' et G'' décrivent deux courbes qui augmentent en fonction de la fréquence et se croisent en un point donné. La valeur de temps de relaxation  $\lambda$  correspond à l'inverse de la fréquence au point de croisement. Le  $\lambda$  d'une solution de polymère correspond au temps caractéristique nécessaire pour retrouver un état d'équilibre après une sollicitation. Ainsi, le paramètre  $\eta_0$  donne des informations sur la viscosité de la solution alors que le paramètre  $\lambda$  fournit des informations sur son élasticité.

La méthode de détermination des paramètres  $\eta_0$  et  $\lambda$  est efficace et simple néanmoins cela contraint à ce que le plateau newtonien ou le croisement de G' et G'' se trouvent dans la gamme de fréquence de cisaillement (ou de vitesse de rotation) atteignable par le rhéomètre utilisé. En fonction de la sensibilité de l'appareil et de la viscosité de la solution, la gamme de fréquence peut aller de 0.04 rad/s à 100 rad/s. Dans le cas de l'étude, la sensibilité de l'appareil a limité la détermination des  $\eta_0$  de plus de 50 Pa.s et la détermination des  $\lambda$  de moins de 0,01 seconde. Afin de s'affranchir de cette limite et déterminer ces deux paramètres de manière plus précise, une loi de comportement et un modèle rhéologique ont été utilisés : la loi de Carreau-Yasuda [120] et le modèle de Maxwell [121].

Carreau-Yasuda 
$$\eta = \eta_{\infty} + (\eta_0 - \eta_{\infty})[1 + (\lambda \dot{\gamma})a]^{\frac{n-1}{a}}$$
 Equation 2  
 $\eta = \eta_0[1 + (\lambda \dot{\gamma})a]^{\frac{n-1}{a}}$  Equation 3

La loi de Carreau-Yasuda (C-Y) décrit la viscosité apparente d'une solution de polymère en fonction d'une vitesse de rotation  $\dot{\gamma}$ . Celle-ci prend en compte les viscosités  $\eta_0$  et  $\eta_{\infty}$ , le temps de relaxation  $\lambda$ , l'indice de pseudoplasticité n et l'indice a<sup>5</sup> (Equation 2). La courbe de viscosité décrit un premier plateau  $\eta_0$  à faible vitesse de rotation, un effet rhéofluidifiant puis un second plateau  $\eta_{\infty}$  à vitesse de rotation durant les analyses, l'équation a été simplifiée en ne prenant en compte que le premier plateau  $\eta_0$  (Equation 3).

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> L'indice a permet d'ajuster la transition plus ou moins rapide entre le plateau newtonien à faible vitesse de rotation et l'effet rhéofluidifiant.

Equation 4

Equation 8

Maxwell

$$G'(\omega) = \sum_{i}^{N} \frac{G_{i}\omega^{2}\lambda_{i}^{2}}{1+\omega^{2}\lambda_{i}^{2}} \qquad G''(\omega) = \sum_{i}^{N} \frac{G_{i}\omega}{1+\omega^{2}}$$
$$\lambda_{W} = \frac{\sum_{i}^{N} G_{i}\lambda_{i}^{2}}{\sum_{i}^{N} G_{i}\lambda_{i}} \qquad \lambda_{R} = \frac{\sum_{i}^{N} G_{i}\lambda_{i}}{\sum_{i}^{N} G_{i}}$$

Le modèle de Maxwell décrit un matériau viscoélastique en combinant un élément élastique et un élément visqueux placés en série. Dans ce cas, un modèle de Maxwell généralisé est utilisé où N modèles de Maxwell sont placés en parallèle. Il décrit les modules de conservation G' et de perte G" en fonction de la fréquence de cisaillement  $\omega$ , du module de relaxation G et de N temps de relaxation (Equation 4). Ce modèle considère une distribution en temps de relaxation liée à la distribution de masse molaire du polymère. Ainsi, il est possible de déterminer le temps de relaxation moyen en masse  $\lambda_w$  et le temps de relaxation moyen en nombre  $\lambda_n$  (Equation 4).

A partir de la méthode des moindres carrés, les paramètres  $\eta_0$  et  $\lambda$  ont pu être déterminés en comparant les modèles avec les points expérimentaux obtenus sur le logiciel EXCEL. La viscosité  $\eta_0$  a pu être déterminée à partir du modèle de C-Y et les temps de relaxation  $\lambda$  ont pu être déterminés à partir des graphiques et des deux modèles, Maxwell et C-Y. Dans le cas du modèle de Maxwell, les temps de relaxation moyen en masse  $\lambda_w$  et en nombre  $\lambda_n$  ont été déterminés. En fonction des points expérimentaux utilisés pour les modèles, l'incertitude sur  $\eta_0$  et  $\lambda$  a été estimée à environ ± 10% et ± 0,01 seconde, respectivement, pour les valeurs de  $\lambda$  inférieures à 0,1 seconde.

Détermination de la viscosité intrinsèque des polymères  $\geq$ 

La viscosité intrinsèque [ŋ] de chaque polymère a aussi été déterminée à partir des valeurs de la concentration C (g/100cm<sup>3</sup>) des solutions de polymère, de leur viscosité relative  $\eta_{rel}$  et de leur viscosité spécifique  $\eta_{spec}$  lorsque leur concentration tend vers 0 (Equations 5 et 6) [122]. Ces deux derniers paramètres  $\eta_{rel}$  et  $\eta_{spec}$  dépendent de la viscosité du solvant  $\eta_{solv}$  et de la viscosité  $\eta_0$  (Equations 7 et 8).

$$\begin{array}{ll} \textit{Viscosité intrinsèque} & \left[\eta\right] = \lim_{C \to 0} \frac{\eta_{spec}}{C} \left(1\right) \quad \left[\eta\right] = \lim_{C \to 0} \frac{\ln(\eta_{rel})}{C} \left(2\right) & \textit{Equation 5\&6} \\ \\ \textit{Viscosité relative} & \eta_{rel} = \frac{\eta_0}{\eta_{solv}} & \textit{Equation 7} \\ \\ \textit{Viscosité spécifique} & \eta_{spec} = \frac{\eta_0 - \eta_{solv}}{\eta_{solv}} = \eta_{rel} - 1 & \textit{Equation 8} \end{array}$$

Viscosité spécifique

La viscosité intrinsèque de chaque polymère a été déterminée à partir des graphiques de n<sub>spec</sub>/C et  $\ln(\eta_{rel})/C$  en fonction de la concentration C (Annexe 1). Les valeurs obtenues sont indiquées dans le Tableau 2-2.

Tableau 2-2 Valeurs des viscosité intrinsèques obtenues à partir des graphiques de  $\eta_{spec}/C$  et  $\ln(\eta_{rel})/C$  enfonction de la concentration C.

Polymère	PEO	PEO	PEO	PLGA	PLGA	PLGA	PCL
	180kDa	900kDa	5MDa	410kDa	570kDa	1,6MDa	160kDa
Viscosité intrinsèque (ml/g)	152	553	1627	203	269	585	156

# 3. Corrélation entre propriétés viscoélastiques et comportement au filage

Dans cette première partie de résultats, les valeurs de viscosité et d'élasticité des solutions ont été organisées sous la forme de modèle pour les relier à la concentration et la masse molaire du polymère. Ces données ont ensuite été comparées à la stabilité du jet de polymère sous champ électrique ou la morphologie des matériaux déposés.

### 3.1 Caractérisation rhéologique des solutions de polymère

Les analyses viscoélastiques réalisées à 25°C ont permis de caractériser la viscosité  $\eta_0$  et le temps de relaxation  $\lambda$  de chaque solution. A partir de ces données l'objectif est de construire un modèle de prédiction reliant directement ces propriétés viscoélastiques à la concentration de la solution et la masse molaire du polymère. Dans la littérature, il est déjà possible de trouver un modèle capable de relier directement la viscosité spécifique  $\eta_{spec}$  d'une solution de polymère au paramètre C[ $\eta$ ] [123] (Figure 2-9). Ce paramètre correspond au produit de la concentration C et de la viscosité intrinsèque [ $\eta$ ] d'un polymère.



*Figure 2-9 Graphique reliant la viscosité spécifique au paramètre C[ŋ]* [123].

Ce modèle est intéressant car il permet d'obtenir une tendance unique de  $\eta_{spec}$  en fonction de la concentration et indirectement de la masse molaire  $M_w$ . Le paramètre [ $\eta$ ] dépend effectivement de  $M_w$  du polymère suivant l'équation suivante [124], [125] :

 $[\eta] = K.M_w^a \rightarrow \log([\eta]) = \log(K) + a \times \log(M_w)$  Equation 9 et 10

K et *a* correspondent aux coefficients de Mark-Houwink caractéristiques de l'interaction d'un couple polymère-solvant à une température donnée. Ces coefficients peuvent être déterminés de manière expérimentale en traçant les valeurs expérimentales du log([ $\eta$ ]) en fonction du log(M<sub>w</sub>) (Equation 10). Ainsi, après détermination des coefficients de Mark-Houwink, les courbes de  $\eta_{spec}$  en fonction du nouveau paramètre C.K.M<sub>w</sub><sup>a</sup> ont été tracées. Afin de pouvoir comparer l'évolution de la viscosité et du temps de relaxation, ce dernier a aussi été tracé en fonction du paramètre C.K.M<sub>w</sub><sup>a</sup>.

> Détermination des coefficients de Mark-Houwink

Les coefficients de Mark-Houwink peuvent être déterminés expérimentalement si au moins deux polymères de masses molaires et de [ $\eta$ ] différentes ont été analysés. Cela est le cas pour les couples PEO-Eau et PLGA-HFIP mais ce n'est pas le cas pour le couple PCL-HFIP pour lequel, une seule masse molaire a été étudiée. Ainsi les constantes *K* et *a* ont pu être déterminées pour ces deux couples à partir des graphiques des log([ $\eta$ ]) en fonction du log(M<sub>w</sub>) (Equation 10). *K* correspond à l'ordonnée à l'origine des droites et *a* correspond à la pente de la droite (Figure 2-10).



Figure 2-10 Détermination des coefficients de Mark-Houwink K et a à 25°C pour les couples PEO-Eau et PLGA-HFIP à partir des tracés des valeurs expérimentales de  $[\eta]$  en fonction de  $M_w$ .

Les valeurs obtenues pour le PEO-Eau dans l'eau à 25°C sont de 0,667 pour la constante *a* et 6,8.10<sup>-3</sup> mL/g pour la constante *K* dans la littérature [126]. Dans le cas de cette étude, le *a* est de 0,71 et le *K* est de 2,9.10<sup>-2</sup> mL/g. La différence entre les deux couples de paramètres peut s'expliquer par le nombre de points expérimentaux moins importants dans le cas de cette étude ou par la différence de gamme de masse molaire étudiée. Pour le couple PLGA-HFIP, des constantes *a*=0,77 et *K* = 9,6.10<sup>-3</sup> mL/g ont été obtenues. A ma connaissance, aucune information sur les constantes de Mark Houwink du couple PLGA (85/15)-HFIP n'est présente dans la littérature. Néanmoins, les données fournisseurs (CORBION) des polymères indiquent que les constantes du PLGA (85/15)-chloroforme sont *a*=0,69 et *K*=3,3.10<sup>-2</sup> mL/g ce qui est très proche de ce qui a été obtenu.

### Viscosité

Les valeurs de viscosité  $\eta_0$  ont été déterminées graphiquement pour des valeurs inférieures à 50 Pa.s puis ont été déterminées par le modèle de C-Y pour des valeurs supérieures à 50 Pa.s pour lesquelles le plateau newtonien n'est pas visible. Après avoir vérifié la concordance entre ces deux méthodes de détermination, ces valeurs ont été utilisées pour déterminer les valeurs de  $\eta_{spéc}$  (Equation 8) pour chaque solution de polymère. A partir de ces valeurs et des constantes de Mark-Houwink, les graphiques de  $\eta_{spéc}$  en fonction du paramètre C.K.Mw<sup>a</sup> ont été obtenus pour les solutions de PEO-Eau et de PLGA-HFIP. N'ayant pas pu déterminer les constantes de Mark-Houwink du couple PCL-HFIP, les valeurs  $\eta_{spéc}$  ont été tracées en fonction du paramètre C[ $\eta$ ]. Les courbes sont présentées en Figure 2-11.





(d)

Couple	Régime	Paramètre C.K.M <sub>w</sub> ª ou C.[η]	Equation
	Dilué	0,1 - 1	$\eta_0 = 1, 1. \eta_s [C. 0,029. M_w^{0,71}]^{1,0} + \eta_s$
PEO-Eau	Semi-dilué	1 - 10	$\eta_0 = 8,2.10^{-1}.\eta_s [C. 0,029.M_w^{0,71}]^{1,9} + \eta_s$
	Enchevêtré	10 - 100	$\eta_0 = 1,6.10^{-3}.\eta_s [C. 0,029.M_w^{0,71}]^{4,6} + \eta_s$
	Dilué	0,3 - 4	$\eta_0 = 1.9. \eta_s [C. 0.0096. M_w^{0.77}]^{1,2} + \eta_s$
PLGA-HFIP	Semi-dilué	4 - 6	$\eta_0 = 1, 1. \eta_s. [C. 0,0096.M_w^{0,77}]^{2,0} + \eta_s$
	Enchevêtré	6 - 40	$\eta_0 = 7,3.10^{-2}$ . $\eta_s$ . [C. 0,0096. $M_w^{0,77}$ ] <sup>3,3</sup> + $\eta_s$
	Dilué	0,8 - 4	$\eta_0 = 1, 3. \eta_s. [C. 156]^{1,4} + \eta_s$
PCL-HFIP 160kDa	Semi-dilué	4 - 8	$\eta_0 = 9,2.10^{-1}.\eta_s.[C.156]^{1,8}+\eta_s$
	Enchevêtré	8 - 55	$\eta_0 = 2,9.10^{-2}.\eta_s.[C.156]^{3,1}+\eta_s$

Figure 2-11 Corrélation des résultats de viscosités avec la concentration et la masse molaire des polymères. (a) Courbes caractéristiques de viscosité spécifique en fonction du paramètre C.K.Mw<sup>a</sup> ou C.[η] du couple PEO-Eau, (b) PLGA-HFIP et (c) PCL-HFIP à 25°C. (d) Liste des équations de prédiction de la viscosité η₀ des couples de PEO-Eau, PLGA-HFIP et PCL-HFIP en fonction des différentes gammes du paramètre C.K.Mw<sup>a</sup> ou C.[η] et du régime de dilution des solutions.

Les résultats obtenus montrent la superposition des courbes des trois masses molaires du PEO et du PLGA. De plus, pour chaque couple polymère-solvant, trois pentes apparaissent avec des coefficients

de régression linéaire acceptables entre 0,86 et 1. Ces résultats confirment ce qui est présent dans la littérature sur le modèle de prédiction de la n<sub>spéc</sub> de solutions de polymère [123] (Figure 2-11). Ces trois pentes correspondent effectivement aux trois régimes de dilution d'une solution de polymère : régime dilué, semi-dilué et enchevêtré. Les valeurs de pente des régimes dilué et semi-dilué sont généralement de 1 et 2 quel que soit le couple polymère-solvant (Figure 2-9). L'évolution de la viscosité ne dépend pas du polymère ou son solvant car les polymères forment des pelotes isolées qui n'interagissent pas entre elles. Les valeurs obtenues sont assez proches : entre 1,4 et 1,0 pour le régime dilué et entre 1,8 et 2,0 pour le régime semi-dilué. Concernant le régime enchevêtré, des interactions apparaissent entre chaînes de polymère formant des points d'enchevêtrements. La pente n dépend donc, dans ce cas, de la nature du polymère et de son affinité avec le solvant. La nature du polymère module la force d'interaction présente sur les points d'enchevêtrements des chaînes alors que l'affinité du solvant module le déploiement de la chaîne en solution et donc le nombre d'enchevêtrements qu'elle peut créer. Dans le cas de l'étude, des pentes de 4,6 ont été trouvées pour le PEO-Eau, 3,3 pour le PLGA-HFIP et 3,1 pour le PCL-HFIP. La viscosité semble donc évoluer beaucoup plus rapidement en fonction de la concentration pour le PEO. Il est aussi intéressant de remarquer que la transition vers un régime enchevêtré est obtenu pour un paramètre C.K.M<sub>w</sub><sup>a</sup> ou C.[ $\eta$ ] d'environ 10 quel que soit la polymère. La caractérisation rhéologique de solutions aqueuses de PEO a déjà été réalisée dans la littérature [127]. Une pente d'environ 5 avait été trouvée et la transition vers un régime enchevêtré avait été obtenu pour un paramètre C. $[\eta]$  d'environ 10, ce qui est très proche des valeurs obtenues ici. Aucune étude citant la caractérisation rhéologique de PLGA ou PCL dans l'HFIP n'a été trouvée dans la littérature. Ces caractérisations peuvent donc représenter des informations précieuses pour la communauté scientifique.

Les courbes de tendance de chaque régime de dilution ont été extraites des graphiques afin d'établir des modèles de prédiction généralisés pour les solutions de PEO dans l'eau et de PLGA dans l'HFIP. Un modèle a aussi été établi pour les solutions de PCL dans l'HFIP pour le polymère de 160 kDa. L'ensemble des équations obtenues est présenté en Figure 2-11-(d). A chaque gamme de C.K.M<sub>w</sub><sup>a</sup> ou C.[ $\eta$ ] correspond un régime de dilution et une équation reliant la viscosité  $\eta_0$  en fonction de C et la M<sub>w</sub> de solutions de PEO dans l'eau ou PLGA dans l'HFIP et la viscosité  $\eta_0$  en fonction de C de solutions de PCL à 160 kDa.

#### Temps de relaxation

Le temps de relaxation  $\lambda$  d'une chaîne de polymère est le temps caractéristique que prend une chaîne de polymère pour retrouver un état d'équilibre après avoir subi une sollicitation. Il dépend de la longueur de la chaîne et de la masse molaire du polymère. Afin de comparer les temps de relaxation entre eux, ceux-ci ont été présentés, comme la viscosité  $\eta_0$ , en fonction du paramètre C.K.M<sub>w</sub><sup>a</sup> ou C.[ $\eta$ ]. Les temps de relaxation ont été déterminés à partir des courbes de G' et G'' (inverse de la fréquence de cisaillement à l'intersection des courbes) ( $\lambda$  graph) et suivant les deux modèles Maxwell et C-Y ( $\lambda$  C-Y). Les temps de relaxation moyens en masse  $\lambda_w$  et moyens nombre  $\lambda_n$  ont pu être déterminés à partir du modèle de Maxwell. Ces différentes courbes obtenues sont présentées en Figure 2-12.



Figure 2-12 Résultats des temps de relaxation déterminés par méthode graphique et par les modèles de Maxwell et de C-Y tracés en fonction des paramètres C.K.Mw<sup>a</sup> ou C.[η].

Les temps de relaxation obtenus suivant différentes méthodes et pour les différents polymères, montrent une évolution similaire en fonction de C.K.M<sub>w</sub><sup>a</sup> ou C.[ $\eta$ ]. Les temps de relaxation évoluent de manière linéaire sur une échelle logarithmique. Ceci est le cas pour tous les polymères, excepté pour le PCL 160 kDa. Les solutions de PCL analysées ont présenté des temps de relaxation assez faibles, inférieurs à 0,1 seconde et proches de 0,01 seconde. Ces temps de relaxation ont été déterminés à partir de fréquences élevées pour lesquelles la sensibilité du rhéomètre n'est pas optimale.. Les résultats sont sûrement moins fiables. La géométrie couette qui a été utilisée pour le PCL afin d'éviter l'évaporation de l'HFIP, a limité l'analyse de solutions plus concentrées et de temps de relaxation plus importants. Il est aussi possible de noter que les valeurs de  $\lambda_w$  obtenues avec les modèles de Maxwell et les valeurs de  $\lambda$  de C-Y sont très similaires. Les courbes obtenues sur les graphiques en fonction de C.K.M<sub>w</sub><sup>a</sup> sont effectivement confondues. D'autre part, les valeurs de  $\lambda_n$  de Maxwell sont aussi très proches des valeurs de  $\lambda$  déterminées à partir des courbes G' et G''( $\lambda$  graph). Il semblerait donc que le modèle de C-Y puisse déterminer un temps de relaxation proche de  $\lambda_w$  et que la détermination graphique puisse définir un temps de relaxation proche de  $\lambda_n$ . Sur les différentes conditions, il est aussi possible de remarquer que les valeurs de  $\lambda_w$  sont plus élevées que celles de  $\lambda_n$  de presque une décade. Cela n'est pas étonnant car les chaînes de polymère de masse molaire plus importante ont tendance à induire des temps de relaxation plus longs. Pour la suite de cette étude, nous avons choisi d'étudier le temps de relaxation le plus long, qui correspond à la valeur de  $\lambda_w$ . Il a effectivement été montré que les temps de relaxation les plus longs gouvernent souvent les propriétés des matériaux et leur comportement en filage [128], [129].

Les valeurs de  $\lambda_w$  obtenues par le modèle de Maxwell ou de C-Y sont plutôt proches. Ainsi, afin de récolter le plus d'informations possibles et obtenir une régression fiable, les deux valeurs ont été utilisées pour la suite de l'étude. Les temps de relaxation des solutions de PCL n'ont pas été exploités car ceux-ci ne semblent pas fiables au vu des autres résultats. Les courbes d'évolution des temps de relaxation  $\lambda_w$  ont été tracées pour les solutions de PEO-Eau et PLGA-HFIP en Figure 2-13.

Contrairement à l'évolution de la viscosité  $\eta_{spéc}$ , les temps de relaxation obtenus à partir des différentes masses molaires ne se superposent pas pour former une courbe unique. Des droites distinctes sont formées avec des coefficients de régression plus faibles que ceux obtenus sur l'évolution de la viscosité. Ceux-ci se situent entre 0,8 et 0,97, sauf dans le cas du PEO à 180 kDa et le PLGA à 570 kDa pour lesquels les valeurs sont de 0,68 et de 0,47 respectivement. Les valeurs de pentes des droites obtenues sont proches et à paramètre C.K.Mw<sup>a</sup> égal, les  $\lambda_w$  sont légèrement plus importants lorsque les masses molaires sont élevées Des courbes de tendance ont été obtenues pour chaque polymère de masse molaire différente. Cela ne permet pas d'obtenir un modèle de prédiction généralisé mais un modèle peut, tout de même, être établi pour les différentes masses molaires analysées. Les équations produites à partir des courbes de tendance sont listées en Figure 2-13-(c).

Ces résultats ont permis de caractériser de manière approfondie le comportement rhéologique de l'ensemble des solutions de polymères. La fiabilité des résultats de viscosité a été démontrée par la bonne corrélation entre les résultats obtenus dans cette étude sur les solutions de PEO et ceux présents dans la littérature. Afin de compléter ces études, des analyses préliminaires de viscosité élongationnelle ont aussi été réalisées à partir d'un rhéomètre HAAKE CABER 1. Cependant aucune
corrélation n'a été trouvée entre la concentration de la solution et son comportement lors des analyses.

Pour la suite de l'étude et la caractérisation du comportement en électrofilage, ces mêmes solutions ont été testées. Au vu du nombre important de solutions, le PLGA 570 kDa n'a pas été utilisé.



(c)	Couple	Masse molaire M <sub>w</sub>	Paramètre C.K.M <sub>w</sub> <sup>a</sup>	Equation
	PEO-Eau	180 kDa	17 - 120	$\lambda_w = 2,0.10^{-5} [C.1,6.10^2]^{2,5}$
		900 kDa	7 - 75	$\lambda_w = 2,0.10^{-5} [C.4,9.10^2]^{3,0}$
		5 MDa	10 - 90	$\lambda_w = 1, 0.10^{-4} [C. 1, 6.10^3]^{2,8}$
		410 kDa	10 - 40	$\lambda_w = 4, 4.10^{-6} [C.2, 0.10^2]^{2,6}$
	PLGA-HFIP	570 kDa	7 - 30	$\lambda_w = 1,9.10^{-3} [C.2,6.10^2]^{0,8}$
		1,6 MDa	6 - 30	$\lambda_w = 1,5.10^{-3} [C.5,7.10^2]^{1,4}$

Figure 2-13 Corrélation des résultats de temps de relaxation avec la concentration et la masse molaire des polymères. Courbes de  $\lambda_w$  en fonction du paramètre C.K.M $_w^a$  du couple PEO-Eau (a), et du couple PLGA-HFIP (b) à 25°C. (c) Liste des équations de prédiction de  $\lambda_w$  des couples de PEO-Eau à 180 kDa, 900 kDa, 5 MDa, PLGA-HFIP à 470 kDa, 570 kDa et 1,6 MDa sur la gamme C.K.M $_w^a$  analysée.

## 3.2 Evolution de la stabilité du jet de polymère

Pour témoigner de la stabilité du jet de polymère, la longueur de jet stable (LJS) qui correspond à la distance entre la pointe de l'aiguille et l'apparition de la première instabilité, a été mesurée pour chaque essai en électrofilage. Les essais ont été réalisés avec une distance de travail de 10 cm et une température de 20°C et une humidité de 40%. L'évolution de la LJS a été tracée en fonction du paramètre C.K.M<sub>w</sub><sup>a</sup> pour les couples PEO-Eau et PLGA-HFIP et C[η] pour le couple PCL-HFIP. Elles ont ensuite été comparées à la  $\eta_{spéc}$  et au  $\lambda_w$  des solutions (Figure 2-14). L'incertitude de mesure de la LJS a été reportée sur les graphiques.

Les LJS semblent évoluer avec une tendance similaire pour chaque polymère : les LJS augmentent d'abord lentement en fonction du paramètre C.K.M<sub>w</sub><sup>a</sup> ou C[η] puis augmentent brutalement jusqu'à la longueur maximale de 10 cm (la distance de travail aiguille-collecteur) pour former ensuite un plateau. Dans le cas du PEO par exemple, les évolutions de LJS pour les PEO 180 kDa et 900 kDa sont très

proches. Lorsque le paramètre C.K.M<sub>w</sub><sup>a</sup> des solutions est entre 26 et 27, les solutions présentent des LJS de 10 cm, ce qui correspond à un jet stable. Cette similarité de comportement est également observée lorsque la LJS est tracée en fonction de  $\eta_{spéc}$  ou de  $\lambda_w$ , bien qu'un manque de points expérimentaux pour la solution PEO 900 kDa au voisinage de l'augmentation de la LJS ne permette pas de vérifier complètement cela. Les intervalles de valeurs de viscosité et d'élasticité pour laquelle la LJS augmente fortement sont donc les suivants entre 2500 et 11000 pour  $\eta_{spéc}$  et entre 0,12 et 0,50 seconde pour  $\lambda_w$ .



Figure 2-14 Corrélation des résultats de LJS du jet en électrofilage avec les propriétés viscoélastiques des solutions utilisées de PEO-Eau, PLGA-HFIP et PCL-HFIP.

En ce qui concerne les solutions de PEO 5 MDa, la LJS évolue avec la même tendance que pour dans le cas des masses molaires plus faibles, mais la forte augmentation de valeur de LJS intervient pour des valeurs plus faibles en abscisse. Des LJS de 10 cm ont été atteintes pour un paramètre C.K.M<sub>w</sub><sup>a</sup> plus faible de 50% (12) et des valeurs de  $\eta_{spéc}$  et de  $\lambda_w$  plus faibles de presque une décade : 60 et environ 0,03 seconde, respectivement. Ainsi, de manière surprenante, pour des concentrations aussi faibles que 7 mg/mL, ce polymère de très haut poids moléculaire est capable d'éliminer les instabilités du jet.

Les tracés correspondant aux solutions de PLGA-HFIP présentent une allure identique à celle des courbes précédemment commentées. Dans ce cas, des LJS de 10 cm ont été atteintes pour un paramètre C.K.M<sub>w</sub><sup>a</sup> compris entre 17 et 26 ou pour  $\eta_{spéc}$  compris entre 1400 et 1800. L'écart entre les sauts de LJS (LJS faible vers élevée), obtenu pour les deux masses molaires (410 kDa et 1,6 MDa), est plus important pour le tracé en fonction de  $\lambda_w$ . En effet, une LJS de 10 cm a été atteinte à partir d'une valeur de  $\lambda_w$  de 0,02 seconde et de 0,10 seconde pour les solutions de PLGA 410 kDa et PLGA 1,6 MDa, respectivement. Contrairement à ce qui a été observé pour le PEO, cette tendance ne va pas dans le sens d'une masse molaire plus élevée puisque la transition à une valeur de  $\lambda_w$  plus faible est observée

pour une masse molaire plus faible. Autre différence notable, lorsque les solutions utilisées possèdent les propriétés de celles qui sont la zone de transition (LJS augmente rapidement), la LJS peut varier de quelques cm à 10 cm en fonction du temps ou en fonction de la tension électrique appliquée. Ces variations ont été représentées par des barres d'erreur allant jusqu'à 10 cm. L'origine de ce phénomène sera discutée plus en détail dans la partie qui suit.

Pour l'évolution des LJS des solutions de PCL-HFIP à 160 kDa, celles-ci atteignent 10 cm pour un paramètre C[η] de 55 et pour  $\eta_{spéc}$  de 9300. Les valeurs de LJS n'ont pas été comparées à celles de  $\lambda_w$  car, pour rappel, elles sont trop faibles pour être mesurées dans de bonnes conditions dans ce dernier cas (partie 3.1).

Afin de caractériser plus finement la transition entre des jets de polymère instables (LJS<10 cm) et des jets stables (LJS=10 cm), d'autres essais en électrofilage ont été réalisés avec des distances de travail (DT) de 20 cm et des concentrations intermédiaires. Ces essais ont été réalisés sur les solutions de PEO-Eau. Les résultats des LJS ont été comparés aux résultats obtenus pour une DT de 10 cm en Figure 2-15.



Figure 2-15 Evolution des LJS en fonction de C.K.M<sub>w</sub><sup>a</sup> des solutions de PEO-Eau pour des DT de 10 cm ou de 20 cm.

Les résultats obtenus sur les LJS avec une DT de 20 cm sont très similaires à ceux obtenus avec une DT de 10 cm. Cela est aussi le signe que les expérimentations sont très reproductibles. Les LJS augmentent d'abord légèrement en fonction du paramètre C.K.M<sub>w</sub><sup>a</sup> puis augmentent rapidement jusqu'à la LJS maximum de 20 cm. Entre 10 et 20 cm de DT, la transition d'un jet instable à un jet stable est identique. Il semblerait donc qu'à partir d'un seuil, les instabilités du jet n'apparaissent plus quel que soit la DT et peut-être de manière irréversible. En analysant des concentrations intermédiaires aux concentrations initialement analysées, ces résultats ont aussi permis d'affiner la transition obtenue pour les trois polymères. Le Tableau 2-3 liste les propriétés viscoélastiques des solutions à partir desquelles des jets stables ont été obtenus pour l'ensemble des polymères. Il est possible de remarquer que, grâce à l'ajout de nouvelles concentrations, la transition de  $\eta_{spéc}$  et  $\lambda_w$  pour un jet stable est maintenant très proche pour les PEO 180 et 900 kDa. Celle-ci est entre 1300 et 1800 pour  $\eta_{spéc}$  et entre 0,11 et 0,07 pour  $\lambda_w$ .

Couple	M <sub>w</sub>	Paramètre C.K.M <sub>w</sub> <sup>a</sup> ou C[ŋ]	$\eta_{\rm spéc}$	λ <sub>w</sub>
	180 kDa	26 ±3	1300 ±100	0,11 ±0,1
PEO-Eau	900 kDa	26 ±3	1800 ±200	0,07 ±0,01
	5 MDa	12 ±1	63 ±6	0,03 ±0,01
	410 kDa	20 ±2	1400 ±100	0,02 ±0,01
PLGA-HFIP	1,6 MDa	17 ±2	1800 ±200	0,10 ±0,01
PCL-HFIP	160 kDa	55 ±6	9300 ±900	-

Tableau 2-3 Liste des valeurs seuil des propriétés viscoélastiques des solutions à partir desquelles des LJS importantes de 10 ou 20 cm ont été atteintes sans instabilités du jet.

Pour résumer l'ensemble de ces résultats, il semblerait que des tendances similaires aient été obtenues pour les polymères PEO 180 et 900 kDa, et PLGA 410 kDa et 1,6 MDa. Pour une  $\eta_{spéc}$  très proche entre 1300 et 1800, les solutions présentent des jets stables. Pour ces mêmes solutions, les  $\lambda_w$  sont plus dispersés, entre 0,02 et 0,11 seconde. Cela est sûrement lié à l'incertitude obtenue sur la méthode de détermination qui a pu être mise en évidence par la dispersion parfois importante des valeurs de  $\lambda_w$  en fonction du paramètre C.K.M<sub>w</sub><sup>a</sup> (Figure 2-13). Les solutions de PEO 5 MDa et PCL 160 kDa pour lesquelles des jets stables ont été obtenus, présentent des  $\eta_{spéc}$  différentes des autres polymères. Le PEO de très haut poids moléculaire a une  $\eta_{spéc}$  et un  $\lambda_w$  faible de 63 et 0,03 seconde, respectivement, alors qu'au contraire, le PCL présente une  $\eta_{spéc}$  élevée de 9300 et un  $\lambda_w$  très faible (<0,01 seconde). Il semblerait donc qu'une masse molaire importante du PEO permette d'obtenir une transition vers un jet stable pour une  $\eta_{spéc}$  et un  $\lambda_w$  plus élevés dans le cas du haut poids moléculaire (1,6 MDa). Des tendances différentes ont donc été obtenues pour les polymères dont la masse molaire dépasse un million de dalton mais aussi pour les solutions de PCL 160 kDa. De manière évidente, la viscoélasticité n'expliquerait pas entièrement le phénomène de stabilisation du jet.

#### Origine des variations de LJS

Comme expliqué précédemment, certaines solutions situées dans la zone de transition, ont présenté des LJS variables malgré des conditions de filage stable. Les solutions concernées (PLGA à DT = 10 cm, PEO à DT = 20 cm) se situent dans la zone de transition entre un jet instable et un jet stable. La LJS a pu évoluer en fonction de la puissance du champ électrique ou du temps. Concernant la puissance du champ électrique, en fonction des conditions, la LIS a augmenté ou diminué quand le champ augmentait. La puissance du champ électrique semblerait donc amplifier ou gommer les instabilités du jet. La force du champ électrique permet d'étirer la solution de la pointe de l'aiguille vers le collecteur. Cette force a donc tendance à minimiser le chemin qu'emprunte le jet en direction du collecteur, ce qui pourrait expliquer pourquoi le champ électrique a tendance à diminuer les instabilités. En revanche, le champ électrique est aussi la cause de l'apparition des instabilités. Effectivement, les instabilités sont liées à la présence de charges électriques créées par le champ. Au plus les solutions sont conductrices, plus elles sont sensibles à la puissance du champ électrique. Il est alors possible qu'une conductivité plus importante des solutions soit responsable d'une diminution de LJS dans certains cas en fonction de la puissance du champ électrique. Dans le cas où la LJS varie en fonction du temps, elle varie entre deux longueurs fixes de manière périodique. La fréquence de ces alternances était généralement d'environ une seconde. Compte tenu des connaissances actuelles, il semble difficile d'envisager une évolution périodique des propriétés de la solution. Toutefois, cette variation pourrait s'expliquer par la création d'un régime transitoire. Il est effectivement possible que les propriétés de ces solutions soient à la limite d'un équilibre sensible entre les forces responsables

de l'apparition des instabilités et les forces permettant de les gommer. A ma connaissance, rien n'a été reporté dans la littérature sur un tel phénomène.

## 3.3 Morphologie du matériau déposé par électrofilage

La corrélation entre propriétés viscoélastiques de solutions de polymère et la morphologie des filaments obtenus en électrofilage est un sujet déjà largement étudié. A ce jour, il est possible de trouver dans la littérature plusieurs études mettant en évidence les différentes propriétés impliquées dans la formation de filaments uniformes ou perlés. C'est d'abord en 2004 [130], qu'une étude a révélé le lien entre la morphologie des filaments et le régime de dilution de la solution de polymère utilisés. Il a été conclu que des filaments uniformes, sans perles, pouvait être obtenus en augmentant la concentration de la solution jusqu'au régime enchevêtré. En 2006, l'équipe de Rutledge montre plutôt l'importance de l'élasticité dans la formation et la morphologie des filaments et démontre que la présence d'enchevêtrement n'est pas nécessaire à la formation de filaments uniformes [131]. La tension de surface de la solution a aussi été étudiée dans ce contexte : il a été montré qu'elle pouvait aussi avoir un rôle dans la formation de filament uniforme [114].

Il existe différents points de vue sur le lien entre la viscoélasticité d'une solution et la morphologie des filaments obtenus. Afin de donner un point de vue nouveau, la morphologie du filament déposé par électrofilage a été comparée à la viscoélasticité des solutions étudiées pour les couples PEO-Eau, PLGA-HFIP et PCL-HFIP. Chaque essai d'électrofilage a été réalisé dans des conditions similaires (partie 2.2), avec une distance de travail de 10 cm et une température et une humidité de 20°C et 40%. Seule la tension a dû être adaptée pour se trouver dans des conditions stables de filage.

Solutions de PEO-Eau

La Figure 2-16 présente la corrélation entre les matériaux obtenus par électrofilage et les propriétés viscoélastiques des solutions utilisées de PEO-Eau.

Les matériaux obtenus ont d'abord été comparés en fonction des valeurs de  $\eta_{spéc}$  des solutions (Figure 2-16-(b)). Différents groupes de solutions ont été choisis sur le graphique reliant  $\eta_{spéc}$  et C.K.M<sub>w</sub><sup>a</sup>. Le groupe 1 correspond à des solutions dont la concentration se trouve dans le régime dilué proche du régime semi-dilué. Le groupe 2 rassemble des solutions de concentrations qui sont dans le régime semi-dilué proche du régime enchevêtré. Le groupe 3 correspond à des concentrations qui sont dans le régime enchevêtré proche du régime dilué et les solutions du groupe 4 sont dans le régime enchevêtré avec des viscosités plus importantes. Dans le cas des solutions de PEO 180 kDa et 900 kDa, des gouttelettes (spray) ont été obtenues pour le régime dilué (1), des filaments perlés pour le régime semi-dilué (2) et des filaments pour le régime enchevêtré (3 et 4) (Figure 2-16-(a)). Cela correspond donc bien à ce qui est avancé dans la littérature sur le lien entre régime de dilution et la morphologie des filaments électrofilés [130].

Un comportement relativement nouveau a été remarqué sur les solutions du groupe 4. Les filaments semblent s'être déposés de manière localisée et s'être enroulés sur eux-mêmes. Cela n'est pas si surprenant car ces deux solutions présentent des jets stables entre l'aiguille et le collecteur. Les matériaux obtenus avec le PEO 5 MDa présentent des différences avec les deux autres polymères. Dans le régime dilué, il est effectivement possible d'obtenir de fins filaments humides au lieu d'obtenir du spray. Dans le régime enchevêtré, quelques filaments perlés peuvent aussi être produits. Concernant la solution du groupe 4, le jet de polymère a atteint le collecteur encore sous forme humide et n'a donc formé aucun filament. Il n'est pas étonnant d'obtenir des matériaux humides pour ce PEO

haut poids moléculaire. L'extrait sec de ces solutions étant très faible, la distance de travail utilisée n'est pas suffisante pour évaporer le volume de solvant nécessaire.

Une tendance similaire a donc été obtenue pour les solutions de PEO 180 kDa et 900 kDa : à valeur de  $\eta_{spéc}$  presque identique, les filaments présentent les mêmes morphologies. Pour  $\eta_{spéc}$ , compris entre 0,50 et 1,6, du spray est obtenu. Entre 15 et 70, des filaments perlés sont obtenus, entre 240 et 1800 ce sont des filaments homogènes qui se forment et entre 10500 et 11600, le jet stable a tendance à induire l'enroulement du filament sur lui-même. Néanmoins, les solutions de PEO 5MDa se comportent différemment pour les mêmes  $\eta_{spéc}$ . Pour une valeur de  $\eta_{spéc}$ , d'environ 1,6, des filaments humides sont obtenus et à environ 11000 des filaments perlés sont obtenus. Pour des masses molaires de 180 et 900 kDa, le PEO semble donc suivre la loi énoncée dans l'article de 2004 [130] mais ce n'est pas le cas pour le très haut poids moléculaire. Cela montre donc que la morphologie des matériaux obtenus n'est pas seulement gouvernée par la viscosité de la solution et son régime de dilution.



Figure 2-16 Corrélation entre la morphologie des matériaux déposés par électrofilage et les propriétés viscoélastiques des solutions utilisées de PEO-Eau. Morphologie des matériaux obtenus (a) corrélation avec les valeurs de viscosité (b) et les valeurs de temps de relaxation (c).

Le même type de tracé a été effectué en utilisant le temps de relaxation ( $\lambda_w$ ) en ordonnée (Figure 2-16-(c)). Il n'a pas été possible de déterminer les temps de relaxation pour les solutions de faibles concentrations comme les solutions du groupe 1 et la solution du PEO 180 kDa du groupe 2. Les filaments perlés des solutions de PEO 900 kDa et de 5 MDa (groupe 2) possèdent des  $\lambda_w$  entre 0,003 et 0,02 seconde. Les solutions de 180 kDa et 900 kDa, pour lesquels des filaments uniformes ont été produits (groupe 3), possèdent des valeurs de  $\lambda_w$  relativement proches entre 0,05 et 0,06 seconde. La solution du PEO 5 MDa du groupe 3 possède cependant un temps de relaxation  $\lambda_w$  dix fois supérieur (0,6 seconde). Concernant les solutions du groupe 4 pour lesquelles les filaments produits à partir des solutions de PEO 180 et 900 kDa se sont enroulés sur eux-mêmes, celles-ci présentent des  $\lambda_w$  compris entre 0,29 et 2,1 secondes. Dans ce même intervalle de valeurs, des filaments perlés ont également été obtenus. Aucune tendance significative n'a donc été révélée entre la morphologie des matériaux obtenue et le temps de relaxation des solutions.

Solutions de PLGA-HFIP

L'analyse du lien entre la morphologie des matériaux déposés sous champ électrique et leurs propriétés viscoélastiques a aussi été réalisée dans le cas du couple PLGA-HFIP. La corrélation entre les deux paramètres est présentée en Figure 2-17.



Figure 2-17 Corrélation entre la morphologie des matériaux déposés par électrofilage et les propriétés viscoélastiques des solutions utilisées de PLGA-HFIP (a) corrélation avec les valeurs de viscosité et (b) les valeurs de temps de relaxation.

Des groupes de solutions ont aussi été choisis sur le graphique reliant  $\eta_{spéc}$  et C.K.M<sub>w</sub><sup>a</sup> (Figure 2-17-(a)-(b)). Dans ce cas, le groupe 1 correspond à des solutions présentes dans le régime semi-dilué proche du régime dilué. Le groupe 2 correspond des solutions du régime enchevêtré proche du régime semi-dilué et les groupes 3 et 4 correspondent à des solutions du régime enchevêtré de viscosité plus importante. Seulement deux masses molaires ont été étudiées pour le PLGA : 410 kDa et 1,6 MDa. Dans le régime semi-dilué de la solution du groupe 1 de PLGA 410 kDa, des filaments perlés ont été obtenus alors que leur morphologie devient uniforme à partir des solutions du groupe 2 du PLGA 410 kDa et 1,6 MDa (Figure 2-17-(a)). Ces résultats sont donc cohérents avec ceux issus des essais avec les PEO 180 kDa et 900 kDa et ceux de la littérature [130]. Les matériaux obtenus sur les solutions du groupe 3 et 4 montrent des structures assez particulières. Des fils composés de filaments enroulés sur eux-mêmes ont été produits et ont formés des structures en 3D. Dans le cas de la solution du groupe

4 du PLGA 410 kDa, le filament s'est enroulé en cercles concentriques et a formé un tapis de filament. Dans ce cas également, les solutions utilisées ont présenté des jets stables jusqu'au collecteur. Contrairement aux solutions de PEO, les filaments des solutions de PLGA s'enroulent en formant des structures 3D comme si les filaments étaient plus attirés par l'enroulement qu'ils forment plutôt que par le collecteur.

En comparant la morphologie des filaments à la viscosité spécifique des solutions (Figure 2-17-(a)-(b)), on s'aperçoit que les filaments évoluent d'une structure perlée à une morphologie plus uniforme lorsque la viscosité spécifique de la solution de PLGA 410 kDa passe de 3 à 420-450. Les filaments enroulés se sont formés pour une valeur de  $\eta_{spéc}$  allant de 1100 à 19000.

Ces matériaux obtenus sont ensuite comparés au  $\lambda_w$  des solutions (Figure 2-17-(a)-(c)). Les filaments uniformes ont été obtenus sur des solutions de  $\lambda_w$  entre 0,003 et 0,03 seconde. Des filaments enroulés ont été obtenus sur des solutions de  $\lambda_w$  entre 0,02 et 0,10 seconde. Ainsi entre 0,02 et 0,03 seconde, deux types de matériaux peuvent être obtenus. Dans le cas des solutions de PLGA-HFIP à 410 kDa et 1,6 MDa, la morphologie des matériaux déposés semblent être davantage liée à la valeur de la viscosité spécifique ( $\eta_{spéc}$ ) que de celle du temps de relaxation ( $\lambda_w$ ). Cela est visible en comparant les images correspondant aux points 2-gris et 3-bleu du graphique. A temps de relaxation similaire, la géométrie des structures formée est différentes.

Solutions de PCL-HFIP

La même analyse a été réalisée pour quelques solutions de PCL-HFIP à 160 kDa. La corrélation entre les matériaux déposés sous champ électrique et  $\eta_{spéc}$  est présentée en Figure 2-18.

La solution 1 correspond au régime semi-dilué, la solution 2 se trouve dans le régime enchevêtré, comme la solution 3 qui est également plus visqueuse. De manière surprenante, du spray a été obtenu pour la solution 1 alors que celle-ci se trouve dans un régime semi-dilué à  $\eta_{spéc}$  de 35. Des filaments uniformes ont été obtenus pour la solution 2 du régime enchevêtré pour une  $\eta_{spéc}$  de 640 et des filaments enroulés ont été obtenus pour la solution 3 pour une  $\eta_{spéc}$  de 9300. Il n'est pas étonnant de retrouver des filaments enroulés pour la solution 3 car le jet produit à partir de cette solution était stable jusqu'au collecteur. Ces filaments semblent être arrivés sur le collecteur avec une teneur résiduelle en solvant plus importante que dans le cas du PLGA puisqu'ils ont tendance à s'étaler au contact de la surface. Cela est surprenant car l'extrait sec de la solution est plus important dans le cas de la solution de PCL. L'interaction polymère-solvant est peut-être plus importante dans le cas du PCL ce qui retarde peut-être l'évaporation du solvant.

Il est difficile de trouver une tendance à partir de ces informations. Néanmoins, ces résultats confirment que la morphologie des matériaux déposés sous champ électrique ne dépend pas d'un seul paramètre mais sûrement de plusieurs. Des filaments perlés peuvent, par exemple, être obtenus pour des solutions de  $\eta_{spéc}$  de gamme très large allant de 3 à 11000. De même pour les filaments enroulés : ceux-ci peuvent présenter des  $\lambda_w$  très différents allant de 0,02 et 2,0 secondes. La viscosité et l'élasticité des solutions sont certainement deux paramètres clés dans la formation ou non des filaments mais il est possible que d'autres paramètres rentrent aussi en compte comme la tension de surface qui n'a pas été étudiée dans ce cas.



Figure 2-18 Corrélation entre la morphologie des matériaux déposés par électrofilage et η<sub>spéc</sub> des solutions utilisées de PCL-HFIP

Un article récent a présenté l'étude de propriétés viscoélastiques de solution de PVA corrélées à leur filabilité et le diamètre des filaments obtenus en électrofilage [132]. Dans ce cas aussi, un lien direct n'a pas été trouvé entre la viscosité ou l'élasticité des solutions. Cependant, une corrélation intéressante a été montrée entre le diamètre des filaments obtenus et le nombre d'enchevêtrements présent en solution. Ainsi une tendance commune a été trouvée entre le diamètre de filaments de PVA à partir de solutions dans l'eau ou du diméthylsulfoxyde (DMSO) et le nombre d'enchevêtrements en solution. Ce paramètre est effectivement intéressant car il prend en compte le déploiement de chaîne en solution et la force d'interaction des chaînes entre elles. Afin de poursuivre l'analyse de ces résultats, il est alors envisager de calculer ce paramètre et les rapporter au comportement en électrofilage caractérisé ici. L'étude citée n'a pas pris en compte le taux de d'évaporation du solvant, sûrement car ce taux est assez faible pour l'eau et le DMSO. Néanmoins, lorsque le solvant est volatile, son taux d'évaporation devrait certainement avoir une influence sur le taux d'étirage du jet et donc sur le diamètre final.

La suite de cette étude s'est consacrée à la détermination du taux d'évaporation de l'eau ou de l'HFIP lors de l'étirage sous champ électrique. In fine, le but sera d'utiliser ces informations pour déterminer l'évolution des propriétés viscoélastiques au sein du jet en fonction du polymère et du solvant.

## 4. Evolution des propriétés viscoélastiques du jet de polymère

L'évolution du diamètre et de la vitesse du jet sous champ électrique sont les paramètres clés de cette étude. Effectivement, à partir de ces deux paramètres l'évolution du flux d'évaporation du jet et donc de la concentration du polymère pourront être déterminés. En couplant ces informations et les équations de prédiction établies précédemment, les évolutions des paramètres de  $\eta_{spéc}$  et de  $\lambda_w$  du jet pourront aussi être déterminées. Ainsi, l'objectif des essais qui suivent est de déterminer de manière presque simultanée la valeur du diamètre et de la vitesse du jet en fonction de la distance de l'aiguille.

Pour cette étude, trois solutions ont été testées. Une solution a été choisie pour chaque couple polymère-solvant. Il s'agit de la solution à partir de laquelle la concentration devient suffisamment importante pour que le jet se stabilise et présente des LIS de 10 ou 20 cm. Les propriétés de ces solutions correspondraient donc aux propriétés seuil à partir desquelles les instabilités du jet sont supprimées. Les caractéristiques des trois solutions choisies sont présentées en Figure 2-19. Les solutions de PEO-Eau 180 kDa à 0,17 g/mL, de PLGA-HFIP 410 kDa à 0,13 g/mL et de PCL-HFIP 160 kDa à 0,35 g/mL ont été choisies. Les solutions de PEO et de PCL présentent des LJS de 10 cm qui sont stables en fonction du temps et du champ électrique. Concernant, la solution de PLGA celle-ci présente des LJS variables en fonction du champ électrique. La LJS était de 10 cm pour une tension inférieure à 6 kV, puis était d'environ 4,5 ± 0,5 cm pour une tension supérieure à 6 kV. La solution de PEO-Eau et de PLGA-HFIP présente des propriétés assez similaires comme les paramètres C.K.M<sub>w</sub><sup>a</sup>, η<sub>spéc</sub>, ou encore  $\eta_0$ . Le temps de relaxation ( $\lambda_w$ ) de la solution de PEO (0,13 s) est cependant plus important que celui de la solution de PLGA (0,02 s). Les grandeurs caractérisant la solution de PCL, comme C[η], η<sub>spéc</sub> et η<sub>0</sub>, présentent des valeurs plus élevées que pour les autres polymères. La valeur de  $\lambda_w$  était néanmoins trop faible pour être déterminée.



1	L	١
(	D	,

Couple	M <sub>w</sub>	Concentration (g/mL)	Paramètre C.K.M <sub>w</sub> <sup>a</sup> ou C[η]	η <sub>spéc</sub>	η <sub>0</sub> (Pa.s)	λw (s)	Tension (kV)
PEO- Eau	180 kDa	0,17	26 ± 3	3300 ± 300	3,3 ± 0,3	0,13 ± 0,01	11,1
PLGA- HFIP	410 kDa	0,13	26 ± 3	3500 ± 400	5,8 ± 0,6	0,02 ± 0,01	6,7
PCL- HFIP	160 kDa	0,35	55 ± 6	9300 ± 900	17 ± 2	Ŧ	6,6

Figure 2-19 Caractéristiques des solutions utilisées pour l'étude de l'évolution du taux d'étirage et des propriétés viscoélastiques du jet de polymère. (a) Les solutions choisies sont désignées par un cercle bleu. (b) Propriétés des solutions choisies.

Les essais en électrofilage ont été réalisés avec une distance de travail aiguille-collecteur de 10 cm, un débit de 0,5 mL/h, et une différence de potentiel de 11,1, 6,7 et 6,6 kV pour les solutions de PEO, PLGA et PCL, respectivement.

## 4.1 Evolution du diamètre et de la vitesse du jet

Afin de déterminer de manière simultanée le diamètre et la vitesse du jet, un premier montage d'électrofilage a été mis en place avec un laser vert et une caméra rapide (LMI, Université Lyon 1) (Figure 2-3). Le diamètre du jet a été déterminé par analyse de contraste d'images acquises par caméra rapide (partie 2.3) et la vitesse a été déterminée par la technique de PIV qui consiste à tracer les particules fluorescentes présentes au sein du jet (partie 2.3). Ces essais ont été réalisés dans des conditions de température et d'humidité contrôlées. La température a été fixée à 20°C et l'humidité à 34% (l'humidité a été diminuée de 40 à 34% car le filage était plus stable). La distance de travail utilisée était de 5 cm. Les résultats de mesure de diamètre et vitesse du jet pour la solution de PEO à 0,17 g/mL sont présentés en Annexe 2. Les résultats de l'évolution du rayon du jet révèlent la forme du cône de Taylor : le rayon du jet est d'abord proche du rayon de l'aiguille (0,4 mm) puis s'affine drastiquement jusqu'à 0,4 mm de distance et se stabilise. A environ 1 mm de distance de la pointe de l'aiguille, le rayon est d'environ 25 µm. Concernant la vitesse, celle-ci semble augmenter de manière linéaire jusqu'à 5 mm de distance de l'aiguille. A 5 mm de distance, celle-ci atteint environ 1,4 m/s. Ces résultats sont intéressants cependant la mesure du diamètre et surtout de la vitesse a été limitée par un éclairage trop faible. Au-delà de 5 mm de distance de l'aiguille, la lumière émise par la traînée des particules fluorescentes qui gagnent en vitesse devient trop faible pour être détectée par la caméra rapide. Aussi, l'éclairage à partir d'une source LED n'a pas suffi pour mesurer des rayons plus fins que 20 µm.

Au vu de ces limites un autre montage a été mis en place et la vitesse du jet a été mesurée par VLD (LMFA, Ecole Centrale de Lyon). Un premier essai a d'abord permis d'analyser l'évolution de la vitesse du jet de PEO dans des conditions de filage similaire. La seule différence était les conditions environnementales car celles-ci n'ont pas pu être pas contrôlées. La température fluctuait entre 17 et 19°C et le taux d'humidité entre 57 et 59%. Une différence assez importante a été observée entre les vitesses obtenues par VLD et par VIP (Annexe 3). Afin de vérifier l'influence des conditions environnementales, de nouvelles mesures de vitesses ont été réalisées en PIV (LMI, Université Lyon 1) en imposant des paramètres de température (17°C) et d'humidité (50%, le système de régulation n'a pas permis d'atteindre une humidité supérieure) proches. Cette fois, les valeurs de vitesses ont permis de vérifier qu'avec les mêmes conditions d'électrofilage et environnementales, des résultats similaires de vitesse étaient obtenus avec les deux techniques. Ces résultats ont aussi permis de confirmer l'influence importante que peut avoir la température et le taux d'humidité sur les conditions de filage.

Pour les essais qui ont suivi, le montage d'électrofilage a été placé sous une boîte en plexiglas afin de confiner les vapeurs de solvant HFIP et contrôler la valeur du taux d'humidité (Figure 2-6, LMFA, Ecole Centrale de Lyon). L'environnement étant plutôt humide, l'humidité a été réduite par l'ajout de gel de silice dans le conduit d''injection d'air de la boîte. Une aspiration continue a permis de maintenir un léger flux d'aspiration pour éliminer les vapeurs de solvant, piégées dans un piège à azote liquide. Malgré le système mis en place, les valeurs de température et d'humidité ont évolué sur une échelle de plusieurs heures. Pour la solution de PEO 0,17 g/mL, celles-ci ont varié de 19 à 22°C et de 60 à 50% et pour le PLGA 0,13 g/mL, de 23 à 25°C et de 45 à 40%, respectivement. Concernant la solution de PCL à 0,35 g/mL, la température s'est stabilisée à 20°C et l'humidité a varié de 53 à 40%. En couplant ce

système avec le laser pour la VLD, un éclairage optimisé avec deux sources LED (une en dessous et l'autre au-dessus du jet) et le montage de la caméra rapide, des mesures de vitesse et de diamètre de jet ont été réalisées entre l'aiguille et le collecteur. Les rayons du laser pouvant endommager le capteur de la caméra, les mesures ont été réalisées en alternant les mesures par VLD et les prises de vidéos.

### Comportement du jet

Le comportement du jet sous champ électrique des trois solutions a déjà été décrit en partie 3.3.2 lors de l'étude de la stabilité du jet. Une parenthèse est de nouveau réalisée sur leur comportement car des différences ont été notées entre les essais précédents et ceux-ci. Il a, par exemple, été remarqué que le jet de la solution de PEO était moins stable et présentait une LJS moins importante (2 cm) que celle qui avait été obtenue pour les essais précédents (10 cm). La différence de comportement pourrait peut-être s'expliquer par une légère différence des conditions ambiantes, mais aussi par la présence des microparticules fluorescentes en solution. Une autre observation a été réalisée : le jet de la solution de PEO était dévié par rapport à l'axe reliant l'aiguille au collecteur (Figure 2-20). Malgré le fait que la paroi supérieure de la boîte en plexiglas était à plus de 20 cm du jet, la trajectoire du jet a sûrement été influencée par la présence de la boîte. Cela a été confirmé car lorsqu'un objet était posé sur le haut de la boîte, la trajectoire du jet a été modifiée. Il est donc important de noter que le champ électrique a pu être modifié par la présence de la boîte et que la présence de particules a pu modifier le comportement du jet lors de ces essais.



Figure 2-20 Images obtenues par la caméra rapide et utilisées pour la mesure des diamètres du jet proche de la pointe de l'aiguille (barre d'échelle: 0,2 mm).

Un comportement légèrement différent a aussi été observé pour la solution de PLGA. Celle-ci présentait des LJS importantes jusqu'à 10 cm comme pour les premiers essais. Néanmoins, une diminution de la LJS a pu être remarquée au cours des mesures de diamètre et de vitesse. A la fin des mesures, la LJS était d'environ 3 cm. Lors des premiers essais, le jet de cette de solution présentait des LJS variables en fonction du champ électrique. Pour ces analyses, le filage a duré entre 1 et 2 heures. Après une telle durée de filage, le collecteur s'est complètement recouvert d'une épaisse couche de filaments ce qui a eu tendance à écranter le collecteur, et donc le champ électrique réellement perçu par la solution. Il est donc possible que, dans ce cas aussi, la variation de la LJS soit causée par une modification du champ électrique. Cela a été confirmé car la LJS a de nouveau augmenté lorsque le jet a été repositionné sur une partie non recouverte du collecteur.

Le comportement du jet de la solution de PCL a été très similaire à celui observé lors des premiers essais, avec une LJS de 10 cm stable dans le temps. Cela a facilité les mesures de diamètre et de vitesse du jet.

### Evolution du diamètre du jet

La mesure du diamètre du jet sur l'axe reliant l'aiguille au collecteur a débuté au niveau de la pointe de l'aiguille (x = 0). Les résultats des mesures sont présentés en Figure 2-21-(a). Le rayon du jet a été

tracé en fonction de la distance de l'aiguille. Les barres d'erreurs liées aux valeurs de rayon ont été déterminées à partir de l'écart-type des valeurs de rayon mesurées sur 3 à 4 images extraites des vidéos.

La mesure du diamètre a pu être effectuée jusqu'à 25 mm de l'aiguille pour la solution de PCL, 20 mm pour la solution de PLGA et 7 mm pour la solution de PEO. Au-delà de ces distances, le diamètre devient trop fin pour être correctement mesuré. Des distances plus importantes que 1 mm ont pu être atteintes pour ces essais grâce à l'éclairage optimisé du montage. Cependant, la distance est restée plus faible pour la solution de PEO par rapport aux deux autres du fait de la présence d'instabilités avec une LJS plus faible et un jet légèrement dévié par rapport l'axe aiguille-collecteur. Cela n'a donc pas facilité la prise de vidéo et la mesure de diamètre.

Concernant l'évolution du rayon du jet en fonction de la distance de l'extrémité de l'aiguille, elle est similaire pour chacune des trois solutions testées (Figure 2-21-(a)). Le rayon est d'abord proche du rayon de l'aiguille (0,4 mm) puis il diminue drastiquement jusqu'à 1 mm de distance pour un rayon d'environ 40  $\mu$ m. Le rayon tend ensuite vers 20  $\mu$ m après 3 mm de distance de l'aiguille. Après 3 mm de distance, quelques divergences peuvent être observées. Pour la solution de PCL, par exemple, le rayon fluctue entre 40  $\mu$ m et 10  $\mu$ m. A 3 mm de distance de l'aiguille, le rayon est de 20  $\mu$ m. A 10 mm, il est de 40  $\mu$ m et à 25 mm, il est de 10  $\mu$ m. Cette fluctuation du rayon est très étonnante car il est difficile d'expliquer une augmentation du rayon sous l'étirage du champ électrique. Il est aussi possible de remarquer que les barres d'erreurs liées aux valeurs de rayon obtenu à 4, 8 et 20 mm de distance sont assez importantes. A 20 mm, celle-ci est de ± 30  $\mu$ m, ce qui représente plus du double du rayon obtenu. Ces incertitudes sont étonnantes car la solution de PCL correspond à la solution dont le jet a été le plus stable lors des essais. Cela révèlent la fluctuation qu'il est possible d'obtenir avec la technique de mesure du diamètre du jet. Ces fluctuations sont sûrement liées à la mise au point de la caméra qui n'a pas toujours été optimale au cours des vidéos. Si le jet n'est pas situé au point focal de la caméra, il peut, en effet, paraître avec un diamètre plus important que la réalité.



Figure 2-21 Résultats des mesures de diamètre du jet en fonction de la distance entre aiguille et collecteur. (a) Graphiques des évolutions des rayons des jets en fonction de la distance de l'aiguille. (b) Graphique de distribution des diamètres de filaments récoltés sur le collecteur après les essais d'électrofilage. La distribution a été réalisée sur 70-100 mesures prises sur 4-5 zones différentes. (c) Graphiques des évolutions de rayons de la pointe de l'aiguille jusqu'au collecteur (échelle logarithmique).

Le diamètre des filaments récoltés sur le collecteur a aussi été mesuré à partir d'images acquises par MEB. Les diamètres des filaments de PCL n'ont pas pu être identifiés car le jet de polymère, très stable, s'est déposé dans un état encore semi-liquide sur le collecteur. Le jet s'est déformé après contact avec le collecteur ce qui n'a pas permis d'obtenir des filaments. Des images MEB acquises sur les filaments d'une solution de PCL à 0,35 g/mL des essais de la partie 3.2 (Figure 2-18 - solution 3) ont cependant permis d'estimer ce diamètre. Le jet de PCL était aussi semi-liquide mais des filaments aplatis d'environ 12 µm de diamètre ont été obtenus. Cette valeur correspond à une valeur surestimée du diamètre du jet avant qu'il soit déformé à l'impact sur le collecteur (l'erreur est sûrement de moitié moins importante). Les distributions des diamètres des filaments de PEO et de PLGA sont présentées en Figure 2-21-(b). Le comportement du jet de PLGA n'ayant pas été stable dans le temps, le diamètre des filaments obtenus au début des essais a aussi été mesuré. Dans le cas du PLGA, ces mesures ont été réalisées sur le dépôt fait après l'analyse de la vitesse lorsque le jet a été redirigé vers un endroit du collecteur non recouvert par les filaments. A ce moment, la LJS était entre 10 et 5 cm. Dans le cas du

PEO, les mesures ont été réalisées sur les premiers filaments déposés. Pour cela, la membrane obtenue après l'essai a été décollée de l'aluminium puis retournée. Les distributions de diamètres des filaments de PEO obtenus en début ou en fin sont très proches. Les deux distributions sont centrées sur environ 0,2 ± 0,1 µm de diamètre. Ces résultats confirment les observations qui ont été réalisées sur le comportement du jet lors des essais : le jet de PEO n'a pas évolué au cours de l'essai. Une légère différence peut cependant être remarquée pour les filaments de PLGA. La distribution des diamètres des filaments obtenus en fin d'essai est centrée sur 1,9 ± 0,1 µm alors que la distribution des diamètres de filaments obtenus au début de l'essai est centrée sur  $2,1 \pm 0,2 \mu m$ . Cette légère différence pourrait s'expliquer par la différence de LJS entre les deux dépôts : celui-ci était d'environ 3 cm en fin d'essai alors qu'il était entre 10 et 5 cm en début d'essai. Ces résultats peuvent être comparés aux valeurs de diamètres mesurés sur les échantillons de la partie 3.2. Lors de ces essais, un échantillon de filament de PLGA avait été analysé après un dépôt à faible champ électrique avec une LJS de 10 cm et après un dépôt à champ électrique plus important avec une LIS de 5 cm (Annexe 4). Avec une LIS de 10 cm sans instabilités, le diamètre était d'environ 2,6  $\pm$  0,7  $\mu$ m. En présence d'instabilités (LJS = 5 cm), le diamètre était d'environ 2,4 ± 0,1 μm. La tendance est donc la même entre les deux essais : sans instabilités, le diamètre des filaments peut être légèrement plus important qu'avec instabilités. Les diamètres restent tout de même très proches ce qui est assez étonnant. Dans la littérature, l'étude du comportement du jet a souvent montré que le taux d'étirage du jet est plus important dans la partie instable que dans la partie stable [73], [74]. Les systèmes étudiés dans ces études sont cependant différents : des solutions de PEO dans l'eau sont étudiées alors qu'il s'agit, dans ce cas, d'une solution de PLGA dans l'HFIP. L'HFIP étant beaucoup plus volatil que l'eau, il est possible que le jet devienne trop rigide par rapport à celui du PEO et soit donc moins capable de s'affiner même en présence d'instabilités. Ces résultats peuvent être confirmés par le taux d'étirage obtenu pour les solutions de PEO-Eau, PLGA-HFIP et PCL-HFIP. Le taux d'étirage du jet entre 7 mm de distance de l'aiguille et le collecteur est d'environ 40 pour le PEO ( $d_{10 \text{ mm}} = 4 \mu \text{m}$  et  $d_{\text{collecteur}} = 0,1 \mu \text{m}$ ) alors qu'il est seulement de 5 pour le PLGA ( $d_{10 \text{ mm}} = 9 \mu \text{m}$  et  $d_{collecteur} = 2 \mu m$ ) et d'environ 1 pour le PCL ( $d_{10 mm} = 15 \mu m$  et  $d_{collecteur} \approx 10 \mu m$ ) (Figure 2-21-(c)). La nature du solvant semble donc avoir une influence majeure sur le taux d'étirage des solutions même à viscosité initiale similaire.

Evolution de la vitesse de jet

Les vitesses de jet de polymère ont été mesurées par la technique VLD. Cette technique permet de déterminer la vitesse des particules en mouvement au sein du jet. Le dispositif utilisé étant équipé de deux couples de lasers cohérents, la vitesse longitudinale U qui est la vitesse parallèle à l'axe aiguille-collecteur et la vitesse transversale V, qui est perpendiculaire à U, ont été déterminées (schéma Figure 2-22). Pour chaque analyse en un point donné, 200 000 points de mesure ont été réalisés à la fois sur la vitesse U et la vitesse V. Une analyse statistique a aussi été réalisée à partir de ces données.

Les vitesses U et V ont été tracées en fonction de la distance de l'aiguille pour les solutions de PEO, PLGA et PCL (Figure 2-22-(a)(b)). Les mesures de vitesse ont été réalisées jusqu'à 20 mm de l'aiguille pour le PEO, 35 mm pour le PLGA et 50 mm pour le PCL. Les distances analysées sont donc beaucoup plus importantes qu'avec la technique PIV pour laquelle la distance limite avait été de 5 mm. Des tendances assez différentes peuvent être observées pour les trois polymères. Concernant les vitesses longitudinales U, le jet de PEO atteint au maximum 10 m/s alors que les jets de PLGA et de PCL atteignent au maximum 3 m/s. Pour les trois polymères, la vitesse augmente d'abord de manière presque linéaire. De la pointe de l'aiguille jusqu'à 4 mm de distance, les vitesses obtenues sont assez similaires mais au-delà, les vitesses évoluent de manière différente. Après 4 mm, la vitesse U du jet de PEO continue à augmenter de manière linéaire pour atteindre environ 10 m/s à 15 mm de distance. La vitesse diminue ensuite de manière étonnante pour atteindre environ 5 m/s à 20 mm. A partir de 15

mm, les écarts types liés aux valeurs de vitesse augmentent aussi brutalement. Concernant les vitesses des jets de PLGA et de PCL, il est intéressant de remarquer qu'après 4 mm de distance, les vitesses stagnent et forment un plateau à environ 3 m/s. La diminution de l'accélération du jet est certainement liée à une diminution de la mobilité des chaînes au sein du jet causée par l'évaporation d'une partie du solvant. Le jet de polymère devient trop rigide pour davantage s'étirer sous la force du champ électrique. Les deux polymères suivent ensuite différentes tendances à partir de 25 mm : la vitesse du jet de PCL reste stable jusqu'à 50 mm de distance alors que la vitesse du jet de PLGA diminue progressivement pour atteindre 1 m/s à 35 mm de distance. L'écart type des valeurs de vitesse du jet de PLGA augmente aussi légèrement à partir de 25 mm.

Les valeurs de vitesses transversales V sont, comme attendu, moins importantes que les vitesses U. La vitesse V mesurée atteint au maximum 2 m/s pour le jet de PEO, et oscille autour de 0 pour les jets de PLGA et PCL. Les mesures de vitesse étant réalisées dans la partie stable du jet, les vitesses V devraient être proches de 0. Ce n'est cependant pas le cas du jet de PEO, ce qui pourrait être expliqué par la déviation de la trajectoire du jet. Il est aussi possible de noter que les écarts-types liés aux valeurs de vitesse V augmentent brutalement à partir de 15 mm pour le jet de PEO et à partir de 30 mm pour le jet de PLGA. Ces distances correspondent aux distances à partir desquelles, la vitesse U de ces deux polymères diminue. Ces résultats montrent que les vitesses fluctuent de manière importante autant sur l'axe longitudinal que sur l'axe transversal, ce qui laisse penser qu'à partir de ces distances, la trajectoire des jets subit des instabilités électrostatiques. Cela expliquerait aussi pourquoi la vitesse longitudinale U diminue. Pourtant, les LJS déterminées visuellement étaient d'environ 30 mm pour le jet de PEO et entre 30 et 100 mm pour le PLGA. Les LJS et les distances seuil à partir desquelles la vitesse U diminue ne correspondent pas mais sont tout de même assez proches.

En prenant en compte son déplacement selon les axes longitudinal et transversal, la vitesse du jet  $(V_{jet})$  a été calculée selon l'équation suivante :

$$V_{jet} = \sqrt{Vitesse U^2 + Vitesse V^2}$$

#### Equation 11

Les vitesses de jet V<sub>jet</sub> ont été tracées en fonction de la distance de l'aiguille (Figure 2-22-(c)). Les vitesses obtenues sont presque identiques aux vitesses longitudinales U ce qui montre que V est négligeable devant U. Ces résultats sont étonnants car la prise en compte des deux axes ne permet pas de corriger les valeurs de vitesses qui diminuent. Il est difficile d'expliquer comment le jet est capable de ralentir sous une force électrostatique considérée comme constante. La vitesse du jet calculée correspond à sa vitesse selon un plan 2D. Afin de que les valeurs de vitesses correspondent à la vitesse réelle du jet, il faudrait pouvoir aussi connaître sa vitesse selon un troisième axe latéral.



Figure 2-22 Résultats des mesures de vitesse de jet de polymère par VLD pour les solutions de PEO 0,16 g/mL, PLGA 0,13 g/mL et PCL à 0,35 g/mL. (a) Graphiques de l'évolution de la vitesse U longitudinale en fonction de la distance. (b) Graphiques de la vitesse V transversale et (c) graphiques de la vitesse de jet en fonction de la distance de l'aiguille.

### > Analyse des mesures de vitesse

Comme expliqué précédemment, les mesures de vitesse en un point donné ont été réalisées à partir de 200 000 mesures de vitesses différentes. Les valeurs de vitesses U et V ont alors été tracées en fonction du temps. A titre d'exemple, ces graphiques ont été tracés pour les trois solutions au niveau proche de l'aiguille (x = 0,2 ou 0,5 mm) puis à 4 et 7 mm de l'aiguille (Annexe 5, Annexe 6 et Annexe 7). 4 mm de distance de l'aiguille correspond au point à partir duquel les vitesses évoluent différemment pour la solution dans l'eau ou les solutions dans l'HFIP alors que 7 mm correspond à la distance à partir de laquelle le jet de PEO continue d'accélérer et les jets de PLGA et PCL stagnent selon une vitesse d'environ 3 m/s (Figure 2-22). De manière surprenante, l'évolution de la vitesse mesurée en fonction du temps évolue de manière différente pour les trois solutions laissant apparaître parfois des fréquences selon lesquelles la vitesse n'est pas mesurée (Annexe 6 et Annexe 7). Le volume d'analyse correspond à un ellipsoïde de 50 µm par 800 µm. Les fréquences correspondent alors au moment où le jet sort de ce volume d'analyse. Ces résultats mettent en évidence un nouveau type d'instabilité assimilé cette fois à la partie rectiligne du jet. Même si le jet est rectiligne sans trajectoire en forme de lasso, il peut vraisemblablement aussi osciller. Ces oscillations étant peu perceptibles à l'œil nu, elles sont sûrement de très faibles amplitudes. Cela est observé sur le jet de PCL et particulièrement sur le jet de PLGA. Les périodes varient entre environ 0,1 et 2 s, ce qui peut être paraître long sur des oscillations de si faible ampleur. Il est aussi possible de remarquer que les valeurs de fréquence, surtout dans le cas du PLGA, ne varient que très peu en fonction de la distance de l'aiguille. Ces instabilités n'étant pas amplifiées comme peuvent l'être les instabilités électrostatique (lasso), nous pourrions supposer que celles-ci ne sont pas d'origine électrostatique. Elles pourraient provenir des flux d'air présents naturellement autour du jet ou sont le résultat de légère perturbation au niveau du cône de Taylor. Il est également intéressant de noter que les fréquences de ces instabilités obtenues sur le jet de PLGA sont proches des valeurs de fréquence estimées sur les variations de LIS en fonction du temps (Figure 2-14). Il est donc possible que ces instabilités de faibles amplitudes soient à l'origine des variations de LIS dans le temps qui amplifie momentanément les instabilités électrostatiques.

## 4.2 Détermination du flux d'évaporation

Comme cela a été démontré en 2007 par le groupe de Renecker [133], le flux d'évaporation du solvant est un paramètre important dans le processus de formation du filament. Ce fait est d'autant plus vrai que le solvant est volatil. Dans le cadre de cette étude, l'HFIP est un solvant très volatil dont la pression de vapeur saturante est de 15 kPa à 20°C (information délivrée par le fournisseur *Synquest Laboratories*) alors que celle de l'eau est d'environ 2 kPa à 20°C. L'évaporation du solvant dans les solutions de polymère a été mise en évidence par le suivi de l'évolution du rapport *volume sur surface* d'une goutte de solution en fonction du temps (Annexe 8). Pour des solutions de concentration en régime enchevêtré, le flux d'évaporation était environ 10 fois plus important dans le cas de solutions de PLGA dans l'HFIP par rapport aux solutions de PEO dans l'eau. Ces résultats présagent donc la différence de comportement en électrofilage des solutions dans l'HFIP par rapport à celles qui sont dans l'eau.

## Stratégie

A partir des valeurs de rayon et de vitesse de jet  $V_{jet}$  déterminées précédemment, l'évolution du débit de solution au sein du jet  $Q_{jet}$  a été calculée selon l'équation 12 en fonction de la distance de l'aiguille.

$$Q_{jet} = \pi r^2 V_{jet}$$

Equation 12

Si on considère un jet découpé en tronçon *i* et *i*+1, les  $Q_{jet}$  des tronçons *i* et *i*+1 notés  $Q_i$  et  $Q_{i+1}$  sont calculés à partir des moyennes de rayon et de vitesse déterminées expérimentalement au début et à la fin des tronçons. La masse de polymère étant conservée pendant le processus d'étirage, les débits de solution de polymère au sein du jet sur les tronçons *i* ( $Q_{Pi}$ ) et *i*+1 ( $Q_{Pi+1}$ ) sont identiques. En reliant cette équivalence avec les fractions volumiques de polymère ( $X_p$ ) et de solvant ( $X_s$ ) sur les tronçons *i* et *i*+1, le débit de solvant évaporé  $Q_{vap}$  peut être obtenu. Celui-ci correspond à la différence des débits  $Q_i$  et  $Q_{i+1}$  (Equation 13).

$$Q_{Pi} = Q_{Pi+1}$$

$$Q_{i}X_{Pi} = Q_{i}X_{Pi+1}$$

$$Q_{i}(1 - X_{Si}) = Q_{i+1}(1 - X_{Si+1})$$

$$Q_{i} - Q_{i+1} = Q_{i}X_{SI} - Q_{i+1}X_{Si+1}$$

$$Q_{i} - Q_{i+1} = Q_{Si} - Q_{Si+1} = Q_{vap}$$
Equation 13

C'est ensuite à partir de cette valeur  $Q_{vap}$  et du débit initial de solution au sein du jet  $Q_0$  que le taux de solvant évaporé cumulé  $X_{vap}$  peut être estimé en fonction de la distance de l'aiguille (Equation 14).

$$X_{vap} = \frac{\sum Q_{vap}}{Q_0}$$
 Equation 14

> Détermination des débits de solution au sein du jet

Les débits de solution au sein du Q<sub>iet</sub> et de solvant évaporé Q<sub>vap</sub> ont été calculés en fonction de la distance à l'aiguille (Annexe 9). Le débit initial Q<sub>jet</sub> (x = 0) n'a pas été calculé, celui-ci correspond au débit imposé par le pousse-seringue (0,5 ml/h ou 5.10<sup>-7</sup> m<sup>3</sup>/h). Les premiers débits Q<sub>iet</sub> déterminés à partir du rayon et de la vitesse se situent à 0,2 ou 0,6 mm de l'aiguille. De manière étonnante, les premiers débits déterminés pour la solution de PEO-Eau et PLGA-HFIP sont largement supérieurs au débit initial du pousse-seringue selon un facteur 18 ou 30, respectivement. Ce décalage aurait pu être lié à une erreur sur les mesures ou sur la position vis-à-vis de la distance de l'aiguille. Pourtant les mesures ont été vérifiées plusieurs fois : des rayons similaires ont été mesurés selon deux à trois séries de mesures et des vitesses presque identiques ont été mesurées à partir de deux techniques (PIV et VLD). De plus, les valeurs de débit, de rayon et de vitesse sont très proches de valeurs que l'on peut trouver dans la littérature lorsque le débit de la solution n'est pas imposé [134]. Nous pourrions alors supposer que le débit induit par le pousse-seringue est, en réalité, plus faible que la valeur indiquée sur l'appareil. Celui-ci impose un débit en ajustant la vitesse de déplacement du piston de la seringue en fonction de son diamètre intérieur. Les solutions utilisées étant très visqueuses, l'intervalle de temps laissé pour stabiliser l'extrusion (plusieurs dizaines de minutes) n'est peut-être pas suffisant pour que la pression au sein de la seringue et donc le débit puissent se stabiliser avant les premières mesures de diamètre et de vitesse.

Il est, de plus, possible de remarquer que les débits calculés varient de manière importante en fonction de la distance de l'aiguille pour les trois solutions. Si on considère que le solvant s'évapore et qu'aucun élément extérieur ne vient s'adsorber sur le jet, le débit devrait diminuer. Ceci est, effectivement, le cas entre environ 0,5 à 1 mm de distance pour le PEO et le PLGA. Cependant, au-delà de 1 mm, les valeurs varient ensuite de manière importante. Ces résultats témoignent certainement de l'incertitude obtenue sur les mesures de vitesse mais surtout de rayon. Dans le cas du PCL, par exemple, il est possible de remarquer qu'une augmentation importante du débit survient lorsque le rayon augmente aussi à 10 mm de distance. Il en est de même pour le PLGA à 15 mm ou le PEO à 2 mm.

Afin de minimiser les variations de rayon et de vitesse obtenues en lien avec l'erreur expérimentale, des courbes de tendance ont été ajustées en fonction des courbes expérimentales (Figure 2-23). Concernant les valeurs de rayon du PEO et PLGA, les évolutions ont été assez bien décrites par deux fonctions « puissance ». Pour la troisième solution, de PCL, l'évolution très aléatoire obtenue entre 5 et 25 mm de distance a nécessité l'utilisation de deux fonctions « puissance » pour décrire les tendances obtenues entre 0,5 et 5 mm puis entre 5 et 25 mm. La première a été ajustée sur les valeurs de rayons obtenues entre 0,5 et 6 mm alors que la deuxième a été réalisée de 1,4 à 6 mm et sur la dernière valeur à 25 mm. Les valeurs entre 6 et 25 mm n'ont pas été prises en compte car elles sont 2 à 3 fois plus importantes que celles obtenues avant 5 mm, ce qui n'est pas cohérent. Ces valeurs de rayons sont donc certainement surestimées par la méthode de mesure (mise au point de la caméra non optimale). Concernant les valeurs de vitesse, une fonction « puissance » a aussi pu décrire assez fidèlement l'évolution des points expérimentaux du PEO. Un léger décalage a tout de même été obtenu sur les vitesses entre 6 et 9 mm. Il est intéressant de remarquer qu'une fonction différente a été utilisée pour décrire les évolutions de vitesse des solutions dans l'HFIP (PLGA et PEO). La vitesse augmente linéairement pour le PEO alors que pour le PLGA et PCL, elle augmente d'abord linéairement puis se stabilise pour former un plateau. Cette différence témoigne des changements de viscosité (perte de mobilité des chaînes en solution) que subit le jet de solution d'HFIP dès les premiers centimètres d'étirage, ce qui n'est pas le cas pour le PEO. Deux fonctions polynomiales d'ordre 5 ont été utilisées pour décrire ces évolutions jusqu'à 7,5 mm pour le PLGA et 15 mm pour le PCL. Au-delà de ces distances, les valeurs théoriques n'ont pas été utilisées car elles divergent des valeurs expérimentales qui forment un plateau. Les trois fonctions utilisées décrivent correctement les valeurs expérimentales de vitesse obtenues proches de l'aiguille (Figure 2-23 - troisième colonne) excepté pour le PCL. Les décalages obtenus sur ce polymère seront discutés à partir des valeurs de débit obtenues.

Les débits de solution au sein du jet ont été à nouveau estimés à partir des valeurs de rayon et de vitesse elles-mêmes extraites des courbes de tendance (Figure 2-24). Il est possible de remarquer que l'utilisation de ces modèles a permis d'éliminer les variations aberrantes qui avaient été obtenues précédemment sur les valeurs expérimentales. N'étant pas du même ordre de grandeur, la valeur initiale de débit induite par le pousse-seringue a été retirée des graphiques, une comparaison relative pourra alors être réalisée entre les solutions. Comme attendu, une diminution progressive du débit a été obtenue pour le PEO et le PLGA en fonction de la distance de l'aiguille. Cela a aussi été observé pour le PCL, mais celle-ci a été précédée d'une augmentation surprenante entre 0,5 et 1,6 mm. Cette évolution est probablement en lien avec l'incertitude obtenue sur les valeurs de rayon et de vitesse dans cette zone. En ce qui concerne la vitesse, nous pourrions supposer que le modèle qui décrivait assez pauvrement les mesures expérimentales entre 0,5 et 3 mm soit la cause (Figure 2-23). Cependant après vérification, l'augmentation du débit a été obtenue dans les deux cas, avec les valeurs expérimentales et théoriques. Ces résultats laissent alors suggérer que les valeurs de vitesse entre 0,5 et 1,6 mm de distance, cependant, les débits diminuent et le Q<sub>vap</sub> devient positif comme attendu.



Figure 2-23 Evolution des valeurs expérimentales de rayon et de vitesse de jet (courbes grises) en fonction de la distance de l'aiguille et les courbes de tendance associées (courbes noires).



Figure 2-24 Débits de solution au sein du jet calculés à partir des rayons et de vitesses déterminés à partir des courbes de tendance pour les solutions PEO-Eau, PLGA-HFIP et PCL-HFIP. La première colonne de graphiques correspond aux rayons et vitesses déterminés à partir des courbes de tendance et la seconde colonne correspond au débit de solution au sein du jet et débit de solvant évaporé en fonction de la distance de l'aiquille.

Taux de solvant évaporé

Le taux d'évaporation cumulé X<sub>vap</sub> a été estimé à partir des valeurs de débits en fonction de la distance de l'aiguille pour les trois solutions (Equation 14, Figure 2-25). Afin de pouvoir comparer relativement les résultats obtenus sur les trois solutions, les taux de solvant évaporé ont été calculés à partir de la même distance de l'aiguille, 2 mm. Il s'agit de la distance à partir de laquelle, le X<sub>vap</sub> a été calculé pour les trois solutions et notamment pour le PCL qui, avant 2 mm, présente des Q<sub>vap</sub> (taux d'évaporation) négatifs. A cette distance de l'aiguille, la zone étudiée correspond à celle qui suit le cône de Taylor (Figure 2-24). Les taux sont ensuite calculés jusqu'à 7 mm pour le PEO, 15 mm pour le PLGA et le PCL. Il est intéressant d'observer des évolutions différentes pour ces trois polymères (Figure 2-25).

En ce qui concerne le PEO, le taux de solvant évaporé augmente linéairement jusqu'à 7 mm selon une pente de 0,024. Le X<sub>vap</sub> augmente aussi linéairement dans le cas du PCL jusqu'à 10 mm avec une valeur de pente deux fois plus élevée (0,040) puis augmente moins rapidement jusqu'à 15 mm. Il en est de même pour le PLGA, dont le taux X<sub>vap</sub> augmente linéairement jusqu'à 5 mm avec une pente encore

environ deux fois plus élevée (0,090) par rapport à celle du PCL. L'augmentation du  $X_{vap}$  progresse ensuite moins rapidement jusqu'à 15 mm.



Figure 2-25 Résultats de taux d'évaporation cumulé du solvant en fonction de la distance de l'aiguille pour les solutions de PEO 0,16g/mL, PLGA 0,13 g/mL et PCL 0,35 g/mL.

Les changements de pente des courbes de X<sub>vap</sub> en fonction de la distance sont probablement témoins des changements de concentration du polymère. Un volume de solvant plus faible et donc moins disponible peut, en effet, causer la diminution de son taux d'évaporation. C'est une relation qui avait été mise en évidence dans une étude antérieure [135]. Le taux d'acétone évaporé dans le cas du filage de l'acétate de cellulose sans champ électrique a été modélisé. Celui-ci diminuait rapidement et se stabilisait après quelques centimètres pour former un plateau. Les auteurs ont expliqué ce phénomène par la formation d'une couche plus rigide et moins riche en solvant à la surface du filament qui est causé par son évaporation rapide. Cela est aussi certainement le cas du jet de PLGA après 5 mm de distance ou du PCL après 10 mm de distance. De plus, ces distances correspondent à la zone à partir de laquelle la vitesse cesse d'augmenter (Figure 2-22). Les résultats de X<sub>vap</sub> confirment alors qu'à ces distances, les chaînes de polymère au sein du jet perdent leur mobilité, ce qui limite l'étirage du jet et l'évaporation du solvant. Les différences de concentration des solutions utilisées expliqueraient alors peut-être aussi les différentes évolutions du Xvap obtenues proche de l'aiguille. Cela semble coïncider pour les deux solutions dans l'HFIP puisque la solution la plus concentrée, le PCL à 0,35 g/mL, présente une valeur de pente plus faible que celle du PLGA à 0,13 g/mL. Il est tout de même risqué de relier directement ces différences à la concentration initiale car cela pourrait aussi dépendre des différentes affinités entre le PLGA ou le PCL avec l'HFIP. Les coefficients de Mark-Houwink du couple PCL-HFIP qui peuvent témoigner de l'affinité polymère-solvant n'ont pas été trouvés dans la littérature pour vérifier cette hypothèse. La même réflexion pourrait être menée entre les tendances obtenues pour le PLGA et le PEO. Dans ce cas, les solutions possèdent des concentrations assez proches en polymère (0,17 g/mL pour le PEO et 0,13 g/mL pour le PLGA) mais des valeurs de pentes différentes ont été obtenues.

La pente est presque 5 fois plus importante dans le cas du PLGA. Une différence d'affinité entre les deux polymères pourrait être la cause mais les coefficients de Mark-Houwink proches des deux couples laissent suggérer que les affinités PEO-Eau et PLGA-HFIP sont proches. Nous pourrions alors supposer que la différence entre les pentes provient d'une différence de volatilité des solvants. L'HFIP s'évapore plus rapidement que l'eau.

L'analyse de ces résultats est récente et toujours en cours. L'étude présentée ici a déjà permis d'extraire des tendances obtenues sur les trois solutions de polymères concernant les évolutions de vitesse et de rayon du jet, et du taux d'évaporation du solvant. Pour la suite de l'étude, il serait alors intéressant de déterminer l'évolution des propriétés viscoélastiques et connaître la viscosité ou l'élasticité à partir de laquelle les chaînes de polymère perdent en mobilité au sein du jet de PLGA et PCL. Cela représentera une première étape dans la compréhension de la stabilisation du jet. Cependant cette transition observée entre 5 et 10 mm de distance de l'aiguille ne semble pas être entièrement responsable de la stabilisation du jet puisque dans le cas du PLGA, des instabilités électrostatiques ont tout de même été obtenues.

## 5. Conclusion

Un nombre important d'information a pu être acquis sur la viscoélasticité de solutions de PEO dans l'eau, de PLGA et de PCL dans l'HFIP et leurs comportements en électrofilage.

La caractérisation rhéologique des solutions de polymère a d'abord permis de déterminer les coefficients de Mark-Houwink pour les couples de PEO-Eau et PLGA-HFIP. L'évolution de la viscosité  $\eta_{spéc}$  et de l'élasticité  $\lambda_w$  des solutions a ensuite été déterminée en fonction de la concentration et de la masse molaire des polymères. Concernant les courbes de  $\eta_{spéc}$ , celle-ci correspondent à des modèles généralisés pour lesquels il est maintenant possible de calculer la q<sub>spéc</sub> à partir de n'importe quelle concentration ou masse molaire des polymères PEO et PLGA (85% en monomère acide lactique). N'ayant pas pu déterminer les coefficients de Mark-Houwink pour le PCL-HFIP, un modèle de  $\eta_{spéc}$  a été établi pour une masse molaire de 160 kDa à partir de sa viscosité intrinsèque [ $\eta$ ]. Les données acquises sur le PEO-Eau étant très proches des valeurs présentes dans la littérature (coefficients de Mark-houwink et  $\eta_{spéc}$ ), ces premiers résultats ont permis de montrer la confiance que l'on pouvait accorder sur les valeurs de viscosités obtenues sur les trois couples polymères-solvant. Les caractérisations rhéologiques des solutions de PLGA et PCL dans l'HFIP sont sûrement des résultats qui pourront servir à la communauté scientifique. L'élasticité caractérisée par  $\lambda_w$  a aussi été tracée en fonction de la concentration et de la masse molaire des solutions. Cela n'a pas abouti sur un modèle généralisé mais ces graphiques obtenues forment des droites à partir desquelles ont été déterminées des équations de tendance. Une confiance relative peut être accordé à ces équations car une dispersion assez importante a parfois été obtenue notamment pour les solutions de PEO 180 kDa et PLGA 570 kDa.

Le comportement du jet en électrofilage a ensuite été caractérisé en fonction de plusieurs critères. La stabilité du jet et notamment la LJS a d'abord été étudiée. Pour les 6 polymères étudiés, la même tendance a été obtenue : **les LJS augmentent progressivement en fonction de la concentration puis augmentent brutalement jusqu'à ce que les instabilités disparaissent complètement**. Cette augmentation importante a aussi été visible en augmentant la distance de travail, ce qui laisse supposer qu'au-delà d'un seuil, les instabilités peuvent être éliminées de manière peut-être irréversible. La transition d'un jet instable à un jet complètement stable a été remarquée entre environ 0,01 et 0,1 seconde de  $\lambda_w$  et entre 10<sup>3</sup> et 10<sup>4</sup> de  $\eta_{spéc}$  sauf pour le PEO 5MDa. Ce PEO de très haut poids moléculaire a permis d'éliminer les instabilités à partir d'une  $\eta_{spéc}$  d'environ 60, ce qui correspond à une concentration très faible de 7 mg/mL. Dans le cas du PCL, au contraire, la stabilisation du jet a été observée pour une  $\eta_{spéc}$  plus importante et un  $\lambda_w$  plus faible.

La morphologie des matériaux déposés sous champ électrique a aussi été comparée aux propriétés viscoélastiques. Comme cela a déjà été montré dans la littérature, du spray a été obtenu pour des solutions diluées, des filaments perlés pour les solutions semi-diluées et des filaments uniformes pour des solutions de polymères enchevêtrés. Une morphologie originale a été trouvée pour l'ensemble des polymères et une n<sub>spéc</sub> d'environ 10<sup>4</sup> où les solutions présentaient généralement des jets stables. Les filaments se sont enroulés sur eux-mêmes pour former des structures humides ou en trois dimensions. Des comportements différents ont cependant été obtenus le PEO 5MDa pour lequel des filaments semblent avoir été obtenus à partir de solutions diluées, et pour le PCL pour lequel du spray a été obtenu à partir de solutions semi-diluées et proche du régime enchevêtré. Encore une fois, ces deux polymères sont les exceptions aux tendances communes observées sur les autres polymères.

La stabilisation du jet et la morphologie des matériaux déposés ne semblent donc pas dépendre seulement de la viscoélasticité des solutions. Il serait intéressant d'étudier la relation entre ces caractéristiques et le nombre d'enchevêtrements en solution, comme cela a été étudié dans un article récent avec le diamètre du filament final [132].

La caractérisation du jet de polymère s'est poursuivie par l'étude de l'évolution du rayon du jet et sa vitesse en fonction de la distance de l'aiguille. Cette analyse a été réalisée sur trois solutions de PEO à 180 kDa, PLGA à 410 kDa et PCL à 160 kDa pour lesquelles des jets stables avaient été précédemment obtenus. **Jusqu'à quelques millimètres de distance, des diamètres très similaires ont été obtenues pour les trois solutions.** Les diamètres finaux sont cependant légèrement différents : environ 0,1 µm pour le PEO, environ 1 µm pour le PLGA et environ 10 µm pour le PCL. Ces différences pourraient s'expliquer par une différence de viscosité entre les solutions de PLGA et PCL et une différence de volatilité du solvant entre les solutions de PEO et PLGA. Concernant la vitesse du jet, des tendances intéressantes ont été distinguées. Les vitesses sont d'abord similaires jusqu'à 4 mm puis continue d'augmenter jusqu'à 10 m/s pour le PEO et stagnent à 3 m/s pour le PLGA et PCL. La diminution de l'accélération de la vitesse du jet est certainement la conséquence d'une transition du jet vers un état vitreux après évaporation du solvant. De manière surprenante, il a aussi été remarqué qu'après un ou plusieurs centimètres de distances, les vitesses diminuent pour les trois polymères. Ce phénomène devrait être lié à l'apparition d'instabilités qui induit une diminution de la vitesse longitudinale.

Les débits de solution au sein du jet ont ensuite été déterminés à partir de valeurs théoriques de rayon et de vitesse extraites de courbes de tendance. C'est à partir de ces valeurs que le taux de solvant évaporé a pu être estimé pour les trois solutions. Ceux-ci ont été déterminés dès la pointe de l'aiguille pour le PEO et le PLGA et à partir de 1,6 mm pour le PCL. Les courbes de l'évolution du taux d'évaporation cumulé en fonction de la pointe de l'aiguille ont permis de mettre en évidence différents régimes. Ceux-ci correspondent sûrement aux changements de concentration de polymère au sein du jet qui peut limiter le taux d'évaporation. Il est, à présent, envisagé de poursuivre l'analyse de ces résultats. Il serait effectivement intéressant de corréler les changements de régime de taux d'évaporation de solvant et de vitesse aux changements de concentration et de viscoélasticité du jet. De même, il serait intéressant de corréler les flux d'évaporation déterminés précédemment à partir d'une goutte de solution avec les valeurs obtenues à partir du jet en mouvement. Cela est actuellement en cours d'analyse.

Cette étude plus fondamentale que les études qui suivent (Chapitre 3, 4 et 5) aura permis de comprendre mieux le comportement du jet sous champ électrique et d'anticiper le comportement des solutions utilisées en électro-impression où des distances de travailles de l'ordre de plusieurs millimètre sont utilisées.

## Chapitre 3

# Observations et étude des phénomènes associés au dépôt localisé en champ proche pour la production de structures organisées

## 1. Objectifs et contexte

La technique d'électro-impression est de plus en plus étudiée depuis 2011. Cela correspond à l'année de publication du premier article mettant en évidence la possibilité de localiser le dépôt de filaments en champ proche et d'empiler les filaments couche par couche [97]. Depuis, un nombre important d'études a vu le jour à propos des différents paramètres à optimiser, géométries et applications qu'il est possible d'envisager. Néanmoins, il existe encore peu d'études destinées à comprendre les différents mécanismes associés à l'empilement des filaments lors du dépôt localisé.

C'est seulement en 2018 qu'une étude de l'équipe de P. Dalton met en évidence les limites physiques de la technologie concernant les dimensions des structures [106]. En effet, les structures produites par électro-impression sont limitées en épaisseur : au-delà d'un certain nombre de couches ou d'une certaine hauteur, des défauts apparaissent dans l'empilement de filaments. Les filaments peuvent être déviés de leur trajectoire initiale et changer de morphologie. Les auteurs de l'article ont relié l'apparition de ces défauts à une modification du champ électrique, lui-même, causé par une densité de charges électriques trop élevée sur les filaments déposés. L'accumulation de charges électriques au sein des filaments déposés par électrofilage est un phénomène déjà connu et assez bien expliqué dans une revue de 2012 [70]. Ces charges, créées au niveau de l'aiguille sous l'action du champ électrique, permettent à la solution de s'étirer sous la forme d'un filament. Une partie des charges est ensuite évacuée lorsque le filament rentre en contact avec le collecteur métallique relié à la masse électrique. Néanmoins, lorsque la structure électrofilée devient plus épaisse, les filaments ne sont plus en contact direct avec le collecteur. Les charges électriques parviennent alors difficilement à s'évacuer et leur densité électrique augmente alors graduellement avec l'épaisseur de la structure [136].

A ce jour, une seule étude a montré qu'il était possible d'augmenter la hauteur des structures sans défauts en électro-impression voie fondue. Cela a été réalisé en maintenant la puissance du champ électrique constante pendant que la structure gagne en hauteur [106]. A l'aide d'un logiciel de simulation, la distance de travail et la tension électrique ont été progressivement augmentées afin de maintenir le champ électrique constant entre l'aiguille et le haut de la structure. Cette stratégie a permis d'augmenter l'épaisseur des structures d'environ 3 mm à 7 mm. Cette étude est donc intéressante mais elle ne permet pas de complètement s'affranchir de cette contrainte car la densité de charges électriques finit tout de même par perturber le champ électrique. Dans le cas de cette thèse, une stratégie différente est proposée afin de s'affranchir de cette contrainte. Il s'agit d'évacuer ou neutraliser, au cours du dépôt, les charges présentes sur la surface des filaments produits par voie solvant.

Ce chapitre est divisé en trois axes. Dans la première partie sont exposés les principaux paramètres utilisés pour optimiser les conditions de dépôt localisé en champ proche comme la vitesse de déplacement, la distance de travail, le débit d'extrusion et la concentration des solutions. Leur influence sur la morphologie et le séchage des filaments est aussi rapidement expliquée. La deuxième partie est consacrée à l'observation et la caractérisation des mécanismes d'empilement des filaments et l'apparition de défauts. Enfin, la dernière partie est consacrée aux essais destinés à s'affranchir de la limite en hauteur des structures en évacuant ou neutralisant les charges électriques résiduelles.

## 2. Matériels et méthodes

## 2.1 Composés et solutions

Les copolymères de grade médical l'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) (viscosité inhérente 2,3, 3,1 et 6,0 dL/g) composés à 85% de fraction molaire en monomère acide lactique ont été achetés chez Corbion. Le polymère de grade médical poly(caprolactone) (PCL) (viscosité inhérente 1,2 dL/g) a aussi été achété chez Corbion. Le solvant 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) a été acheté chez TCI.

Des solutions de PLGA et PCL dans l'HFIP ont été utilisées à 0,13 g/mL et 0,35 g/mL, respectivement. Celles-ci ont été placées dans des seringues de 1 ou 2 mL et extrudées à travers une aiguille de 21G et 22 mm de long dont l'extrémité n'est pas biseautée (« biseau émoussé »).

## 2.2 Système d'électro-impression

L'appareil utilisé pour les essais d'électro-impression a été conçu spécifiquement pour cette étude par l'entreprise française TOBECA qui est spécialisée dans le montage d'imprimantes 3D sur mesure (Figure 3-1). Il s'agit d'un bâti de 2,5 mètres de long, 1,7 m de haut et 1,2 m de profondeur dont les différentes ouvertures peuvent être fermées hermétiquement. Ainsi, l'environnement du système d'électro-impression est clos, ventilé et peut être régulé en température et en humidité.

Dans l'enceinte de l'imprimante, tous les appareils nécessaires à la technique d'électro-impression sont présents comme le système de pousse-seringue, le collecteur amovible en axe X, Y et Z, et une alimentation haute tension (Figure 3-1). Ces trois éléments sont pilotés à partir d'un ordinateur disposant du logiciel REPETIER capable de communiquer avec l'imprimante.



Figure 3-1 Image du système d'électro-impression. (a) Photo de l'imprimante TOBECA avec ses différents systèmes de régulation. (b) Photo du système d'électro-impression et d'observation. (c) Image obtenue à partir de la caméra rapide d'un dépôt localisé en électrofilage champ proche.

## Régulation de l'humidité

Le système de régulation contrôle à la fois un brumisateur d'eau et une électrovanne reliée à un réseau d'air comprimé. Le brumisateur permet l'apport en humidité alors que l'entrée d'air comprimé permet son appauvrissement. Le capteur d'humidité du système de régulation est placé à 10 cm de la pointe de l'aiguille. Ainsi, en contrôlant l'activation d'un de ses deux systèmes d'apport ou d'appauvrissement en humidité, le taux d'humidité de l'environnement proche de l'aiguille peut être régulé entre 25% et 75%. La sensibilité de la régulation autour de la valeur cible est de ± 2%.

## Régulation de la température

La température de l'air de l'enceinte est régulée grâce à un climatiseur réversible pouvant chauffer ou refroidir l'air entre 15 et 30°C. Pour les essais d'électro-impression, la température a été fixée à 20°C.

Système de pousse-seringue

Deux systèmes de pousse-seringues ont été installés au sein de l'imprimante. Il s'agit de deux systèmes d'extrusion dans lesquels une seringue a été placée. La valeur la plus faible atteinte est 0,005 mL/h pour une seringue de 1 mL avec 0,6 pas par seconde.

Pour les essais d'électro-impression, les débits utilisés ont varié de 0,05 mL/h à 0,02 mL/h.

Collecteur amovible

Le collecteur est un plateau métallique carré de 40 cm de côté. Les déplacements selon l'axe X, Y et Z sont contrôlés. Les accélérations des axes ont été fixées à 2000 ou 1000 mm/s<sup>2</sup> et les vitesses de déplacement peuvent atteindre jusqu'à 50 cm/s.

La vitesse d'accélération des axes a été réduite de 2000 à 1000 mm/s<sup>2</sup> pour des raisons d'usure des axes. Effectivement, le poids du collecteur et les vitesses élevées utilisées au cours de la thèse ont induit des contraintes mécaniques importantes sur les axes, ce qui a conduit à une usure après plusieurs mois d'essais. L'usure a surtout été remarquée au niveau des blocs de fixation des axes. Le mouvement du collecteur provoquait le mouvement de l'axe dans le bloc de fixation. Cela a perturbé les essais car le dépôt a énormément perdu en résolution et répétabilité. Ces mouvements perturbateurs ont pu être, en partie, corrigés en déplaçant les blocs vers l'intérieur afin de maintenir les axes en compression. Afin d'induire des déplacements mécaniquement moins violents, l'accélération sur les axes X et Y a donc été réduite à 1000 mm/s<sup>2</sup> au lieu de 2000 mm/s<sup>2</sup>. Pour les essais, une vitesse d'accélération de 1000 mm/s<sup>2</sup> permettait d'atteindre 20 cm/s de vitesse de déplacement sur les distances utilisées (structures faisaient 4 cm de long).

Pour les essais d'électro-impression, les vitesses de déplacement utilisées ont varié de 3 à 25 cm/s. La distance de travail entre la pointe de l'aiguille et le collecteur, fixée par le déplacement sur l'axe Z, a varié de 0,7 à 0,3 mm. Les filaments ont été déposés sur une feuille d'aluminium pour les essais d'optimisation ou des wafers de silicium de 2 pouces de diamètre pour la production de structures organisées.

### L'alimentation haute tension

L'alimentation haute tension est reliée à l'aiguille métallique par laquelle la solution de polymère est extrudée. La tension peut être contrôlée de 0 à 30 kV avec une polarité positive.

La tension a été modulée entre 2,0 kV et 3,6 kV.

Un système d'observation composé d'une caméra rapide et d'une lumière LED a aussi été disposé proche du pousse-seringue afin de pouvoir visionner la pointe de l'aiguille et le dépôt sur l'ordinateur.

## 2.3 Création du GCode

Comme expliqué dans le Chapitre 1, la géométrie des structures produites en fabrication additive est générée à partir d'un logiciel de modélisation 3D. A partir de ce dessin, un fichier STL est ensuite produit et peut être interprété par le logiciel REPETIER capable de communiquer avec l'imprimante. A partir de ce fichier, un GCode est produit en intégrant les coordonnées et vitesses de déplacement et les débits d'extrusion qui permettent d'imprimer la structure. Ces paramètres ne peuvent donc pas être contrôlés car ils sont générés automatiquement par les algorithmes du logiciel. Cette voie ne permet pas non plus d'utiliser des coordonnées micrométriques puisqu'aucune imprimante classique d'extrusion (FDM) ne permet une telle résolution. Afin de contourner ces limites, les différents paramètres à contrôler comme les coordonnées de déplacement micrométriques, les vitesses de déplacement, la tension, et le débit d'extrusion ont été codés manuellement ou par le biais d'un logiciel adapté.

## GCode de déplacement

Un logiciel « fait maison » a été programmé par Colin Bousige et Arnaud Brioude du LMI afin de pouvoir générer des GCodes de déplacement micrométriques suivant plusieurs directions (Figure 3-2).



Figure 3-2 Logiciel de génération de GCode adapté à l'appareil d'électro-impression (a). Exemple de GCode généré à partir du logiciel (b).

Plusieurs paramètres de la géométrie de la structure peuvent être modifiés (Figure 3-2-(a)) :

- *Nombre de couches* : Nombre de couches de filaments superposés que comportera la structure.
- *Nombre de sous-couches* : Nombre de blocs de lignes parallèles.
- · Longueur de la ligne : Longueur des déplacements linéaires pour chaque direction.
- *Pas* : Distance entre les lignes pour chaque bloc de lignes parallèles (interligne).
- *Nombre de lignes* : Nombre de lignes pour chaque bloc.
- · Angle : Angle entre les différents blocs.
- Shift X : Décalage des déplacements linéaires sur l'axe X.
- Shift Y : Décalage des déplacements linéaires sur l'axe Y.

Le GCode produit par le logiciel permet de coder tous les déplacements selon ses coordonnées et sa vitesse de déplacement (Figure 3-2-(b)). Les mouvements sont codés par le terme « G1 ». Ainsi toute

ligne débutant par ce terme correspond à un déplacement. A la suite de ce terme, il est possible de retrouver les coordonnées de déplacement : le code « G1 X12 Y2 » permet, par exemple, d'effectuer un mouvement de 12 mm sur l'axe X et 2 mm sur l'axe Y. Le code de vitesse de déplacement peut aussi être introduit selon le terme « F » : le code « G1 F2000 X12 Y2 » permet, par exemple, d'effectuer ce mouvement avec une vitesse de 2000 mm/min.

> GCode de tension électrique

Le code de la tension électrique permet de contrôler la valeur de la tension que délivre l'alimentation haute tension de 0 à 30 kV par incrémentation de 0,1 kV. Le code « M42 S255 P5 » permet d'abord d'activer la commande de la tension. Le code « M42 S50 P40 » permet ensuite de fixer la valeur de la tension. La valeur correspond au terme « S » : le code « S50 » permet, par exemple, de fixer la tension électrique à 5,4 kV et « S51 » à 5,5 kV.

GCode du débit d'extrusion

Le débit d'extrusion du pousse-seringue peut atteindre jusqu'à 0,005 mL/h pour une seringue de 1 mL et selon une vitesse de 0,6 pas/seconde. Pour coder des débits aussi faibles, le GCode a dû être adapté car la carte électronique de l'imprimante n'était pas capable d'interpréter ces commandes sur une longue durée. Ainsi, le code permettant d'induire une valeur de débit a été divisé en plusieurs lignes de code correspondant à de petits intervalles de temps d'extrusion. Par exemple, pour coder un débit de 0,02 mL/h pendant 10 heures avec une seringue de 2 mL, le code «G1 E0.0023 F0.004965 » est utilisé et copié sur 1200 lignes de code. Chaque ligne de code correspond à 30 secondes d'extrusion. Le paramètre « E » code pour la distance en millimètre extrudé et le paramètre « F » code pour la vitesse d'extrusion en mm/min.

## 2.4 Caractérisation des structures

Les structures produites par électro-impression ont pu être observées par microscopie optique (BX60F5, Olympus Optical) et microscopie électronique à balayage (MEB Merlin Compact, Zeiss).

Le diamètre des filaments a été mesuré grâce au logiciel Image J à partir d'images réalisées en microscopie MEB.

## 3. Résultats et discussion

## 3.1 Optimisation des conditions de dépôt localisé et production de structures

L'optimisation des conditions de dépôt localisé est présentée de manière concise car ce sont des paramètres qui ont déjà été largement étudiés dans la littérature (voir Chapitre 1). Après la présentation de l'optimisation des conditions, différentes structures organisées ont pu être produites.

## 3.1.1 Optimisation des paramètres

Plusieurs paramètres ont été optimisés afin de pouvoir produire des structures composées d'empilements de filaments : la vitesse de déplacement, le débit de solution extrudée, la distance de travail, la tension et la concentration des solutions. La tension électrique a été optimisée pour chaque solution afin de retrouver des conditions stables de filage (les critères de stabilité ont été expliqués Chapitre 2, page 37).

L'ensemble de ces essais d'optimisation a été réalisé dans des conditions d'humidité et de température similaires : 40% et 20°C respectivement.

Vitesse de déplacement

Afin de montrer l'influence de la vitesse de déplacement du collecteur sur les filaments déposés, les résultats obtenus avec une solution de PCL à 0,35 g/mL dans l'HFIP sont présentés (Figure 3-3). La vitesse du collecteur a varié de 1,7 à 17 cm/s pour une distance de travail de 3 mm. De 1,7 à 10 cm/s, les filaments forment différents motifs en se déposant : à 1,7 et 3,3 cm/s des boucles sont obtenus, à 5 et 6,7 cm/s des sinusoïdes et à 10 cm/s, une ligne droite (Figure 3-3-(a)). Ces résultats confirment ce qui a déjà été obtenu dans la littérature sur l'évolution des motifs formés par les filaments en se déposant sur un collecteur amovible. Cela a déjà été remarqué dans le cadre d'une étude sur l'électro-impression [97] mais aussi de manière plus générale sur l'écoulement de fluide visqueux [137], [138]. Il semblerait, effectivement, qu'au-delà d'un seuil de viscosité tout fluide s'enroule sur lui-même lors de son écoulement sur un support [139]. Les motifs obtenus sur l'écoulement de filament visqueux avec ou sans champ électrique sont assez similaires : il est possible de retrouver les motifs en forme de boucles, de sinusoïdes ou de lignes droites (Annexe 10). Ce phénomène n'est donc pas d'origine électrostatique mais est seulement lié au caractère viscoélastique du filament déposé.

Aucun phénomène d'enroulement du filament n'est observé à partir de 10 cm/s. Cela indique donc qu'à 10 cm/s, la vitesse du collecteur (V<sub>c</sub>) a dépassé la vitesse du filament (V<sub>f</sub>). La vitesse du filament peut être ainsi estimée entre 6,7 et 10 cm/s. Ces résultats peuvent être comparés aux vitesses de jet mesurées par vélocimétrie laser à effet Doppler en Chapitre 2 : à 3 mm de distance de l'aiguille, le jet de PCL atteignait 17 cm/s. Le décalage observé entre les valeurs de vitesse de jet de cette étude et l'étude précédente est sûrement lié aux conditions expérimentales. Ici, un débit de 0,02 mL/h a été utilisé alors qu'un débit de 0,5 mL/h a été utilisé en Chapitre 2.



Figure 3-3 Influence de la vitesse de déplacement sur les motifs que forme les filaments déposés (a) (barre d'échelle: 50μm) et sur leur diamètre (b) (barre d'échelle: 10μm).

Il a aussi été remarqué lors de cette étude qu'au-delà de la vitesse critique  $V_c > V_f$ , une diminution du diamètre du filament est observée (Figure 3-3-(b)). L'augmentation de la vitesse de 10 à 17 cm/s a provoqué une diminution du diamètre de 11 à 6  $\mu$ m. Cela confirme aussi les résultats obtenus dans la littérature sur la diminution du diamètre en fonction de la vitesse de déplacement du collecteur [97].

Dans le cadre de cette thèse, des vitesses de collecteur supérieures à la vitesse du filament ont été préférées afin de pouvoir produire des structures composées de lignes droites et de filaments assez fins. L'objectif est, effectivement, de produire des structures organisées et fines afin que la structure puisse interagir avec le milieu biologique et permettre une régénération cellulaire efficace.

Distance de travail

La valeur de la distance de travail a une influence sur le séchage du filament, la vitesse du jet et le diamètre du filament. Plus la distance est grande plus le filament a le temps de sécher, de s'accélérer et de s'étirer. Dans l'absolu, il est donc intéressant de maximiser ce paramètre afin de produire des structures assez sèches et très fines. Cependant, si la vitesse du jet augmente, la vitesse du collecteur doit aussi augmenter afin de rester dans la gamme de vitesse V<sub>c</sub>  $\ge$  V<sub>f</sub>.

La vitesse de déplacement du collecteur peut théoriquement atteindre 50 cm/s. Néanmoins, des vitesses plus faibles ont été préférées afin de préserver la machine et éviter des vibrations trop importantes qui pourraient créer des défauts dans les structures. Tenant compte de ces critères, la distance de travail a été fixée à 3 mm.

Débit de solution extrudée

Le débit de solution extrudée en électrofilage a une influence déjà connue sur le diamètre des filaments obtenus : plus le débit est faible, plus le filament est fin [140]. Au cours des essais, il a aussi été noté que le débit de solution avait une influence importante sur le séchage des filaments en électro-impression. L'utilisation d'un débit assez faible a tendance à faciliter la production de filaments plus secs lorsqu'ils atteignent le collecteur. La dépendance du diamètre du filament au débit de la solution permet d'influencer également la vitesse d'évaporation du solvant dans le filament. En effet, un diamètre plus fin permet d'augmenter le rapport surface/volume du filament, favorisant ainsi l'évaporation du solvant.

Un débit assez faible de 0,02 mL/h a donc été choisi pour les essais d'électro-impression.
# Concentration des solutions

La concentration des solutions et la masse molaire des polymères ont été choisies en fonction de plusieurs objectifs : obtenir un filage stable, obtenir des filaments suffisamment secs lorsqu'ils atteignent le collecteur et obtenir des filaments assez fins.

Les résultats de stabilité au filage des solutions de PLGA et de PCL dans l'HFIP ont été présentés au Chapitre 2. Les solutions analysées ont présenté des longueurs de jet stable (LJS) allant de 0,5 cm à 10 cm. Afin que le jet de polymère soit le plus stable possible en électro-impression, les solutions présentant des LJS importantes jusqu'à 10 cm ont été utilisées.

Afin que le filament puisse sécher rapidement avant d'atteindre le collecteur, des solutions assez concentrées ont été utilisées. Ces solutions présentant un haut pourcentage d'extrait sec, les filaments ont tendance à sécher plus rapidement. Néanmoins, il est aussi intéressant d'utiliser des solutions de viscosité modérée afin de réaliser un compromis entre finesse des filaments et leur séchage. Ainsi, des masses molaires faibles ont été privilégiées afin d'obtenir des solutions concentrées présentant des viscosités raisonnables.

Suite à cette étude, les solutions de PLGA à 410kDa et 0,13 g/mL dans l'HFIP et de PCL 160kDa à 0,35g/mL dans l'HFIP ont été identifiées comme étant les plus pertinentes pour atteindre nos objectifs.

# *3.1.2 Production de structures organisées*

Les deux solutions de PLGA et PCL choisies ont été utilisées pour produire des structures par électroimpression en utilisant les paramètres listés dans le Tableau 3-1. Les solutions sont extrudées selon un débit de 0,02 mL/h et une distance de travail de 3 mm. La tension utilisée pour les solutions de PLGA et PCL est de 2,2 et 2,1 kV, respectivement. La solution de PLGA est déposée avec une vitesse de déplacement de 25 cm/s. Initialement, la solution de PCL a aussi été déposée avec une vitesse de 25 cm/s, cependant lorsque l'accélération des axes a été baissée de 2000 mm/s<sup>2</sup> à 1000 mm/s<sup>2</sup>, la vitesse des dépôts a été diminuée à 20 cm/s (partie 2.2, page 82).

L'ensemble de ces essais a été réalisé dans des conditions d'humidité et de température similaires : 40% et 20°C.

	Débit (mL/h)	Distance de travail (mm)	Tension (kV)	Vitesses de déplacement (cm/s)
PLGA 0,13 g/mL	0,02	3	2,2	25
PCL 0,35 g/mL	0,02	3	2,1	25 et 20

Tableau 3-1 Liste des paramètres optimisés pour l'électro-impression de filaments superposés.

Des structures en forme de grille avec des interlignes de 200 µm ont été produites et déposées sur des wafers de silicium (Figure 3-4). Le GCode utilisé correspond à un motif en forme de grille 2D composé de 10 lignes parallèles et distantes de 200 µm orientées sur l'axe X puis 10 autres sur l'axe Y. Ce motif 2D est multiplié 20 fois dans le GCode afin d'obtenir une grille composée de 20 couches de filaments. En se référant aux images MEB des structures, il est possible d'observer que la structure de PCL correspond bien au motif de déplacement programmé dans le GCode. Il est difficile de compter le nombre de filaments dans l'empilement mais, le filage étant continu, on peut supposer que 20 couches ont été déposées. En revanche, la structure empilée de PLGA est sûrement composée de 20

couches car il est possible d'observer quelques filaments isolés par rapport à l'endroit où s'est formée la grille et donc au motif. Le filage du PLGA dans l'HFIP est effectivement moins stable car il a tendance à produire un multijet, et ce, malgré les efforts effectués pour trouver des conditions stables. Il a, en effet, été difficile de trouver la tension pour laquelle toute la quantité de matière extrudée est étirée tout en évitant un multijet. Afin d'éviter ces instabilités, la tension choisie est donc relativement faible, ce qui a induit la formation d'une goutte à la pointe de l'aiguille après quelques minutes de filage (Annexe 11). Ce phénomène peut faire dévier le jet et créer des décalages dans la structure. La durée de dépôt pour produire les structures de PLGA a donc été réduite à quelques minutes pour éviter cette perte de résolution. La solution de PCL étant beaucoup plus stable sous champ électrique, la durée des dépôts en électro-impression peut durer jusqu'à 1 heure dans des conditions très stables.



Figure 3-4 Images MEB des structures en forme de grille en PLGA 410kDa et en PCL 160kDa obtenues par électro-impression (a). Distribution des diamètres de filaments des structures produites (distribution obtenue à partir de 20 mesures réalisées sur trois grilles) (b).

Une distribution des diamètres de filaments obtenus en électro-impression a été réalisée à partir de la mesure d'une vingtaine de filaments et sur 3 structures différentes (Figure 3-4-b). Les structures de PLGA ont présenté des diamètres de filaments équivalents, d'environ 2,5  $\mu$ m. Les structures de PCL ont, quant à elles, présenté deux diamètres moyens de 3,5  $\mu$ m et 5  $\mu$ m. Cela est dû à l'utilisation de deux vitesses de déplacements. Pour des déplacements de 25 cm/s et 20 cm/s, les filaments obtenus ont des diamètres respectivement de 3,5 et 5  $\mu$ m. Cela témoigne donc de l'influence importante que peut avoir la vitesse de déplacement sur le diamètre des filaments obtenus.

Les diamètres obtenus pour les deux solutions de polymère sont relativement faibles par rapport aux diamètres obtenus dans la littérature (Chapitre 1 – Tableau 1-4 – page 31). Sur les 10 références citées dans le Chapitre 1, les filaments obtenus ont un diamètre généralement supérieur à 10 µm. Cette

différence est sûrement liée à l'utilisation de la voie fondue ou l'utilisation de solutions très concentrées dans la littérature. Par exemple, les solutions de PCL sont souvent utilisées à 70% dans l'acide acétique. Dans notre cas, la concentration en PCL est deux fois moins importante : elle n'est que de 35%. Une concentration plus faible a pu être utilisée tout en obtenant des filaments secs grâce à la volatilité importante de l'HFIP. Cette concentration assez faible permet d'obtenir des solutions assez peu visqueuses qui sont capables de s'étirer davantage. C'est sûrement la raison pour laquelle des filaments presque deux fois plus fins ont pu être obtenus dans le cadre de cette thèse. L'utilisation de solvant très volatil a donc un avantage certain pour la production de structures très fines.

Ces essais ont aussi pu mettre en évidence la possibilité d'utiliser un polymère différent du PCL déjà beaucoup utilisé : le PLGA. Le PLGA est un polymère très intéressant et déjà largement utilisé pour produire des dispositifs médicaux résorbables et biocompatibles pour la régénération tissulaire [118]. Il est donc intéressant de pouvoir l'utiliser en électro-impression. Néanmoins, quelques optimisations restent encore à faire afin de stabiliser le jet sous champ électrique et pouvoir filer pendant un temps plus long que quelques minutes. Il est difficile d'expliquer de telles différences de stabilité entre les solutions de PLGA et de PCL. La caractérisation de ces solutions au Chapitre 2 a montré que les solutions présentent des temps de relaxation très proches (environ 0,02 seconde) mais des viscosités assez différentes. La viscosité de la solution de PLGA est de 5,8 Pa.s alors que la viscosité de la solution de PCL est de 17,2 Pa.s. Cette différence de viscosité aurait pu expliquer la différence de stabilité au filage mais des tests réalisés avec une solution plus visqueuse de PLGA ont montré le même comportement instable. La viscoélasticité n'est donc pas le seul paramètre responsable de la stabilité des solutions au filage. La nature du polymère semble aussi être un paramètre important. Il serait intéressant d'étudier par exemple l'influence de la conductivité et de la tension de surface des solutions de polymère sur la stabilité du filage : les propriétés des solutions de PCL et de PLGA dans l'HFIP pourraient être comparées.

# 3.2 Caractérisation des empilements de filaments et résolution du dépôt

L'objectif des résultats décrits dans cette partie est de comprendre les différents mécanismes d'empilement des filaments et d'identifier les stratégies permettant de limiter l'apparition des défauts dans l'empilement qui surviennent lorsque la structure prend de la hauteur. L'empilement des filaments a d'abord été caractérisé sur des hauteurs de structures assez faibles puis sur des hauteurs plus élevées avec l'apparition de défauts. Comme déjà observé dans la littérature, à partir d'une certaine hauteur de structure, les filaments ont tendance à se repousser et être dévié de leur trajectoire. Néanmoins, à des hauteurs assez faibles, le phénomène est inversé car les filaments ont plutôt tendance à s'attirer entre eux.

Pour des raisons de stabilité au filage, la solution de PCL à 0,35 g/mL a été choisie pour cette étude. Les tests ont été réalisés dans des conditions d'humidité et de température similaires : 40% et 20°C.

# *3.2.1* Hauteur de structure faible : attraction des filaments

L'attraction entre les filaments déjà déposés et les filaments en train de se déposer a été montrée en élaborant une structure particulière. Un GCode a été adapté pour produire une structure en forme de grille de 200  $\mu$ m d'interligne de 20 couches et terminer en déposant une 21<sup>ème</sup> couche composée de 5 lignes sur la grille déjà formée (Figure 3-5- Vignette du haut). Les 20 premières couches ont été réalisées avec une vitesse de déplacement de 25 cm/s et les lignes à partir de la 21<sup>ème</sup> couche ont été réalisées avec des vitesses plus faibles pour chaque ligne : 3,3, 6,7, 10, 13 et 17 cm/s.

Les vitesses de déplacements utilisées pour la 21<sup>ème</sup> couche ont déjà été étudiées en partie 3.1.1 pour déterminer l'influence de la vitesse de déplacement sur le motif d'enroulement du filament. Les filaments de PCL déposés directement sur le collecteur formaient des boucles à 3,3 cm/s, des sinusoïdes à 6,7 cm/s et une ligne droite à 10 cm/s. En conservant les mêmes conditions de filage (tension, distance de travail, température et humidité), des motifs différents ont été obtenus lors du dépôt de filament sur une grille formée. La trajectoire du filament de la 21<sup>ème</sup> couche déposé selon une vitesse de déplacement de 3,3, 6,7, 10, 13 et 17 a été déterminée à partir d'observations au MEB (Figure 3-5 – Vignette du bas). Visiblement, la trajectoire du filament s'est adaptée au motif que forme la grille. Afin de compenser la longueur de filament déposée à faible vitesse de déplacement, celui-ci s'est déposé sur le haut des empilements adjacents au mur formé sur l'axe de déplacement selon un mouvement parfois pendulaire. La trajectoire du filament déposé étant modulée par le dépôt déjà existant, il semblerait donc que celui-ci soit plus attiré par le haut des empilements déjà formés plutôt que le collecteur relié à la masse électrique.



Figure 3-5 Schéma et images de structure produite avec différentes vitesses de déplacement. Vignette du haut : motifs de déplacement du collecteur sous l'aiguille des 20 premières couches (a) et de la 21<sup>ème</sup> couche (b).
Vignette du bas : image optique de la structure fibreuse obtenue (c). Image optique et schéma de la trajectoire des filaments déposés à 25 cm/s sur les 20 premières couches (d). Image optique et schéma de la trajectoire du filament de la 21<sup>ème</sup> couche produite à faible vitesse de déplacement (e). Image MEB d'une partie de la structure (f).

D'autre part, il a été remarqué que lorsqu'un filament est déposé selon des déplacements formant plusieurs lignes parallèles et distantes de 1, 5, 10 ou 50  $\mu$ m, le filament ne se dépose pas selon ces lignes juxtaposées mais s'empile pour former un mur (Annexe 12). C'est à partir de 100  $\mu$ m de distance imposée entre les lignes de déplacement que la tendance est rectifiée : le filament ne s'empile plus et forme plusieurs lignes parallèles selon les déplacements imposés. Dans ce cas aussi, il semblerait que le filament qui se dépose soit attiré par le filament déjà présent sur le collecteur : lorsque la distance entre les filaments est faible, ils se déposent les uns sur les autres. Cette observation mettrait donc en évidence la résolution de la technique. Néanmoins, les distances dont il est question (de 1 à 50  $\mu$ m), se trouvent dans la gamme d'incertitude de repositionnement du collecteur qui est de ± 20  $\mu$ m. Il est donc aussi possible que le collecteur ne se décale pas exactement aux distances imposées, ce qui induirait la superposition des filaments.

De manière plus générale, ce phénomène « d'attraction » entre les filaments pourrait aussi expliquer le mécanisme d'empilement. Cela expliquerait pourquoi il est possible d'empiler des filaments très fins de 2 à 5  $\mu$ m de diamètres les uns sur les autres alors que la précision de repositionnement du collecteur n'est que de ± 20  $\mu$ m. La force présente entre les filaments permettrait certainement de s'affranchir de l'imprécision de déplacement du collecteur et serait responsable de l'empilement des filaments.

Cette force d'attraction potentielle entre les filaments a déjà été mentionnée dans un article antérieur [141]. Les auteurs ont attribué ce phénomène à une internalisation des charges présentes au sein des filaments des premières couches. Selon eux, la différence de potentiel entre ces filaments et le collecteur serait si faible que l'influence de la géométrie physique créée par les filaments sur le champ électrique l'emporterait pour rediriger le filament. Les auteurs mentionnent un effet de pointe créé par la géométrie des filaments permettant de minimiser le chemin entre l'aiguille et le collecteur. Pour confirmer cette théorie, des simulations COMSOL ont été effectuées afin de modéliser l'influence de la présence de filaments sur champ électrique (Figure 3-6).



Figure 3-6 Simulation COMSOL du dépôt localisé d'un filament de 2 μm de diamètre à un potentiel de 2 kV (ligne verticale) sur un support à 0 kV (masse électrique). Sur le support a été placée une géométrie en forme de dôme ou de cercle pour mimer la forme de la section d'un filament plus ou moins étalé sur le support (cas de la première couche déposée). Celui-ci est aussi relié à un potentiel nul (0 kV).

Afin de modéliser le filament en train de se déposer sur le collecteur, un filament vertical en deux dimensions a été modélisé avec un diamètre de 2  $\mu$ m et potentiel de 2 kV sur un collecteur relié à la masse électrique (0 kV). Une géométrie en forme de dôme ou de cercle a été placée à 10  $\mu$ m du filament pour mimer la forme plus ou moins étalée de filaments déjà présents sur le collecteur. Un potentiel nul a aussi été appliqué sur ces formes. Ces simulations ont permis de confirmer que même si les filaments sont étalés, leur géométrie suffit pour faire dévier les lignes de courant en direction des filaments déjà déposés. Ces résultats semblent donc aller dans le sens de l'hypothèse de départ. Il

serait intéressant de compléter cette étude par des mesures de potentiel de surface par microscopie à sonde de Kelvin, ce qui n'a pas pu être réalisé au cours de ce travail.

# 3.2.2 Hauteur de structure élevée

Les filaments s'empilent de manière efficace sur les premières couches déposées mais la tendance est inversée lorsque la structure en forme de grille devient plus épaisse. En effet, au-delà d'une certaine hauteur, des défauts apparaissent dans l'empilement des filaments au niveau de l'intersection des lignes qui forment la grille. Ces défauts sont présentés en Figure 3-7.

Les structures présentées correspondent à des grilles de 200 µm d'interligne. L'image de la Figure 3-7-(a) correspond à une structure de 20 couches de filaments et l'image de la Figure 3-7-(b) correspond à une structure de 50 couches. Dans le cas de la structure de 20 couches, les filaments sont déposés suivant la trajectoire imposée par le déplacement du collecteur (grandes flèches rouges). Cependant, entre 20 et 50 couches, certains filaments ne suivent plus le déplacement du collecteur. Ces filaments sont déviés de leur trajectoire initiale lorsqu'ils se déposent sur la grille (petites flèches rouges). Les filaments passent alors d'un empilement de filaments à un autre sans forcément revenir sur leur empilement d'origine. Lors de cette déviation, il est aussi possible d'observer une modification de la morphologie des filaments (Figure 3-7-(c)). Le diamètre des filaments est souvent affiné comme s'il avait était étiré davantage que les autres. Le phénomène de déviation de la trajectoire des filaments est un phénomène qui a déjà été observé au cours d'une autre série de test en champ proche. Cela a été observé lorsqu'une grille de 5 couches a été déposée sur une lamelle de culture cellulaire en plastique (Figure 3-8).



Figure 3-7 Images MEB de défauts d'empilement des filaments obtenus sur une grille de 200 μm d'interligne et 50 couches. (a) images de filaments déviés de leur trajectoire. (b) images de filaments dont la forme cylindrique a été modifiée.



Figure 3-8 Dépôt en champ proche d'une grille de PCL de 5 couches sur une lamelle de culture cellulaire en plastique. (a) Schéma du motif de déplacement de l'aiguille sur le collecteur composé d'une lamelle déposée sur une feuille d'aluminium. (b) Image optique d'une partie de la structure obtenue. L'image a été prise sur une zone où les filaments sont déposés sur l'aluminium et la lamelle.

La lamelle avait été déposée au centre d'une feuille d'aluminium reliée à la masse électrique. La surface de la lamelle a été reliée à la masse électrique de l'aluminium par du scotch carbone (le plus souvent utilisé pour la microscopie électronique). Le motif de déplacement de l'aiguille sur le collecteur étant plus large que le diamètre de la lamelle, la structure a été formée à la fois sur l'aluminium et sur la lamelle (Figure 3-8-(a)). Une partie de la structure obtenue est présentée sur l'image optique de la Figure 3-8-(b). La trajectoire du filament déposé sur aluminium ou la lamelle est très différente. Sur l'aluminium, des empilements de 5 filaments ont été formés ce qui signifie que les filaments ont suivi la trajectoire imposée par le déplacement du collecteur. Cependant, lorsque les filaments sont déposés sur la lamelle, les filaments sont déviés de leur trajectoire. La lamelle en plastique est un matériau diélectrique qui ne permet pas d'évacuer les charges électriques comme le fait l'aluminium. Le champ électrique présent entre la lamelle et la pointe de l'aiguille est donc modifié ce qui pousse les filaments à changer de trajectoire. Au niveau de la lamelle, les filaments ont été déposés en lignes parallèles monocouches et distantes d'environ 10 µm, ce qui n'a jamais pu être obtenu avec un dépôt sur matériau conducteur (aluminium ou wafer de silicium). Lorsqu'un dépôt est réalisé sur une grille épaisse, le comportement est très similaire. Cela laisse alors penser qu'au-delà d'une certaine épaisseur, la grille se comporte comme la lamelle ce qui confirme que la grille est capable de modifier le champ électrique.

#### 3.2.3 Influence de la densité de la structure

Une série de plusieurs structures en forme de grille présentant différents interlignes et différents nombres de couches a permis de montrer que la hauteur à partir de laquelle ces défauts apparaissent dépend directement de l'interligne imposé. Les tests ont été réalisés avec des interlignes de 100, 200, 400 et 500  $\mu$ m. Plus la distance entre les lignes est importante, plus la hauteur de grille qu'il est possible d'atteindre sans défauts est importante (Figure 3-9-(a)). Pour un interligne de 500  $\mu$ m, la structure a, par exemple, pu atteindre 120 couches sans défauts, ce qui correspond à une hauteur d'environ 480  $\mu$ m pour des filaments de 4  $\mu$ m de diamètre. En revanche, pour un interligne de 100  $\mu$ m, la structure n'a pu atteindre que 20 couches sans défauts, soit environ 80  $\mu$ m de haut. Pour chaque condition, le nombre de couches à partir duquel apparaissent les défauts a été estimé à ± 10 couches environ.



Figure 3-9 (a) Graphique des hauteurs de structure atteintes sans défauts en fonction de l'interligne de la grille.
(b) Graphique du rapport entre le volume de polymère déposé sans défaut par rapport à la surface du collecteur. Les barres d'erreur indiquées correspondent à la différence de rapport que l'on peut obtenir en prenant en compte une variation de +/- 10 couches avant apparition de défauts.

La tendance qu'ont les défauts d'empilement à n'apparaître qu'au niveau de l'intersection des lignes et à apparaître rapidement lorsque la distance entre les lignes est faible, montre que leur apparition est peut-être liée à la densité de filaments déposés. Plus la densité de filaments est importante, plus les défauts risquent d'apparaître sur de faible hauteur de structure. Pour vérifier cette tendance, le rapport du volume de polymère déposé par rapport à la surface du collecteur sur laquelle le polymère a été déposé, a été calculé pour chaque interligne (Figure 3-9-(b)). Ce rapport varie entre 0,6 et 1 de manière non linéaire en fonction de l'interligne. La variation du rapport est assez faible entre les différentes conditions testées. L'apparition des défauts est donc peut-être liée en partie à la densité de polymère déposée sur la surface du collecteur. Au-delà d'environ 0,8 µm<sup>3</sup> de polymère par µm<sup>2</sup> de collecteur, les lignes de champ électrique sont perturbées ce qui ne permet plus de diriger de manière résolue le dépôt du filament. Il serait intéressant de compléter ces données par d'autres simulations de champ électrique COMSOL en fonction de la dimension de la structure déposée. Cela permettrait de donner des informations plus précises sur l'influence de la géométrie sur l'écrantage du collecteur et du champ électrique.

#### 3.3 Neutralisation de charges électriques sur l'empilement de filaments

L'étude de matériaux diélectriques chargés revient à étudier les matériaux que l'on appelle « Electrets ». La capacité de charge ou de décharge de ces matériaux diélectriques est expliquée dans une revue de 2014 [142]. Ces matériaux peuvent être déchargés plus ou moins rapidement en fonction de leur conductivité, d'une décharge corona ou par adsorption de molécules chargées présentes dans l'humidité de l'air. Afin de décharger la surface des filaments qui composent les structures organisées, deux stratégies ont été testées.

La première a été d'utiliser des molécules chargées pour neutraliser la surface. Pour cela, deux sources de molécules chargées ont été étudiées : les ions présents naturellement dans l'humidité de l'air (OH<sup>-</sup> et H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>) et les ions produits par un ioniseur à partir d'une charge corona. Tout d'abord, différents taux d'humidité de l'air ont été utilisés lors de la production de structure. Aussi, afin de vérifier l'influence de l'apport d'ions sur la décharge des filaments déjà déposés, des tests ont été effectués en intégrant des pauses au cours de l'impression pendant lesquelles la structure est soumise à un flux d'air humide ou ionisé (Figure 3-12.) Le but est de neutraliser les charges accumulées au cours de l'impression et

pouvoir ainsi atteindre des structures de hauteur plus importante. Le déroulement de ces essais sera expliqué plus en détail dans les parties 3.3.1 et 3.3.2.

La deuxième a été de neutraliser la charge électrique globale des structures en alternant la polarité du champ électrique lors du dépôt. Les filaments produits à partir d'une tension positive devraient avoir une charge de surface positive alors que les filaments produits à partir d'une tension négative devraient avoir une charge négative.

Les résultats présentés en partie 3.2.3 avaient montré qu'une grille de 200 µm d'interligne et d'environ 30 couches pouvait être atteinte sans défauts à 40% d'humidité. Pour l'étude qui suit, des grilles de 200 µm d'interligne avec 50 ou 80 couches ont alors été testées afin de pouvoir conclure de l'influence des conditions mises en œuvre sur l'apparition des défauts.

Comme expliqué en partie 2.2, les axes sur lesquels est fixé le collecteur amovible se sont usés de manière importante au cours de ces travaux de thèse. Lors de cette étude, des décalages importants ont été remarqués sur un des deux axes (Figure 3-10).



Figure 3-10 Images optiques de grille de 200 μm d'interligne et de 20 couches. (a) structure produite avec axes fixes. (b) structure produite avec un l'axe Y légèrement mobile. Des décalages sur les déplacements en X sont visibles.

Ainsi, au lieu d'obtenir 10 murs parallèles et de même hauteur comme indiqué dans le GCode, une vingtaine de lignes est produite, avec des hauteurs différentes pour chaque ligne. Ces décalages ne sont souvent pas reproductibles ce qui a rendu difficile l'interprétation des résultats obtenus dans cette étude. C'est pourquoi, plusieurs tests ont été renouvelés pour observer une tendance. Lors de l'analyse des résultats, il sera important de différencier les décalages obtenus et les défauts liés à la modification du champ électrique. Les décalages mécaniques produisent des lignes de filaments parallèles sur toute la longueur alors que les défauts liés à une modification du champ électrique correspondent à des filaments déviés seulement au niveau de la grille.

# *3.3.1 Influence de l'humidité*

L'influence d'un air humide a été testée tout au long d'une impression et en l'introduisant localement sur la structure pendant des pauses.

> Contrôle de l'humidité de l'air au cours de l'impression

L'humidité de l'air pendant l'impression de structures a pu être contrôlée grâce au régulateur de l'imprimante. Des taux d'humidité de 30, 40, 60 et 75% ont été testés. Les images optiques des structures de 50 ou 80 couches obtenues sont présentées en Figure 3-11. Les images présentées sur une même ligne correspondent aux structures réalisées sur une même journée.



Figure 3-11 Images optiques des structures en forme de grille de 50 ou 80 couches à 30, 40, 60 ou 75% de taux d'humidité dans l'imprimante. La barre d'échelle correspond à 500 µm.

Il est difficile de quantifier le nombre de défauts car ceux-ci sont souvent présents en grand nombre. Néanmoins, les images optiques obtenues semblent tout de même montrer une tendance. Plus l'humidité est importante, plus le nombre de défauts semble diminuer. Le phénomène est visible sur les structures de 50 et particulièrement sur celle de 80 couches. Lors du premier essai à 80 couches (Figure 3-11 - première ligne), la structure produite à 75% d'humidité contient beaucoup de lignes décalées mais contient seulement 2-3 filaments déviés. A 60%, la structure présente plus de défauts et à 40%, elle en présente davantage. Lors du deuxième essai (Figure 3-11 - deuxième ligne), la structure contient plus d'une trentaine de défauts à 40% d'humidité alors qu'elle n'en contient que quatre à 60%. L'humidité semble donc avoir un réel effet sur l'apparition de défauts. Elle serait donc capable d'éliminer une quantité non négligeable de charges présentes sur la surface des filaments, ce qui permettrait de retarder l'apparition de défauts. La capacité de décharge de l'humidité sur les filaments électrofilés a déjà été citée dans une étude antérieure consacrée à l'étude de la morphologie de filaments [143]. Pour une humidité < 5%, des filaments de PCL rompus avaient été obtenus alors qu'avec une humidité de 50% et à champ électrique constant, des filaments uniformes avaient été obtenus. Les auteurs ont relié la présence de filaments rompus par une densité excessive de charges électriques. Cela a été confirmé puisqu'à 50% d'humidité, des filaments rompus ont aussi été obtenus pour un champ électrique plus important capable de générer plus de charges électriques.

Dans ce cas aussi, l'humidité a pu visiblement décharger la surface du jet de polymère à la fois au niveau de la pointe de l'aiguille et au moment de l'étirage. Il serait intéressant de caractériser les structures obtenues à différents taux d'humidité au MEB. La présence de charges est l'élément permettant d'étirer le jet de polymère. Si l'humidité est capable d'éliminer une partie des charges électriques au niveau du jet de polymère, cela induirait alors une diminution de l'étirage du filament. Il est donc possible que les filaments possèdent des diamètres plus importants à des taux d'humidité importants.

Ces résultats sont très intéressants mais l'inconvénient de cette stratégie est la modification des conditions de dépôt des filaments. Le taux d'étirage des filaments est certainement moins important dans un environnement humide. Afin de ne pas perturber les conditions de filage, d'autres tests ont été effectués en localisant un flux d'air humide sur les filaments déjà déposés.

> Injection d'un flux d'air humide sur filaments déposés

Lors de ces essais, des structures de 50 couches ont été produites en plusieurs fois en intégrant des pauses dans GCode. Le déroulement d'une de ces impressions est schématisé en Figure 3-12.



*Figure 3-12 Déroulement d'une impression intégrant des pauses pour décharger la structure en cours d'impression* 

Pour commencer, 25 couches de filaments sont déposées. A cette hauteur, la structure ne contient généralement pas de défauts d'empilement. Avant de débuter la 26<sup>ème</sup> couche, le collecteur se déplace afin de placer la structure sous la tête de l'ioniseur. Dans le cas de l'étude de l'humidité, l'ioniseur n'est pas en fonctionnement, il est alors utilisé comme une buse pour diriger le flux d'air. Le flux d'air est injecté grâce à une pompe et est ensuite chargé en humidité en passant à travers un bulleur qui peut être chauffé légèrement (Figure 3-12). Le flux d'air humide sort enfin au niveau de la tête de l'ioniseur avec un taux d'humidité de 80 à 95%. Après 5 ou 10 min de pause où la structure a été soumise à un flux d'air humide, l'impression de la structure est poursuivie. Dans le cas où une seconde pause est introduite au cours de l'impression, celle-ci est suspendue à la 35<sup>ème</sup> couche.

L'humidité globale de l'imprimante a été régulée à 40% et la température est de 20°C. Les images optiques des structures obtenues sont présentées en Figure 3-13.

Les images présentées en ligne correspondent aux structures réalisées sur une même journée. A chaque début d'expérience, un échantillon « contrôle » est réalisé. Il correspond à une structure de 50 couches sans pause. Trois paramètres ont été testés : le nombre de pauses, la durée d'une pause et le taux d'humidité. Des taux d'humidité relativement élevés ont été choisis entre 80 et 95% et la durée des pauses a été fixée arbitrairement à 5 et 10 min pour ne pas induire des temps d'impression trop longs.



Figure 3-13 Images optiques de structures de 50 couches obtenues à partir d'une impression ponctuée de pauses afin de neutraliser les charges présentes sur les filaments déposés. Pour cela, un flux d'air humide à 80% et 95% a été utilisé. La barre d'échelle correspond à 500 μm.

Lors du deuxième essai réalisé à partir d'un flux d'air humide à 80%, la structure produite à partir d'une pause de 5 min semble contenir moins de défauts par rapport à la structure contrôle : elle en contient 3-4 au lieu d'une dizaine sur le contrôle (Figure 3-13 – deuxième ligne). Cependant ces résultats n'ont pas été retrouvés lors des deux autres essais (Figure 3-13 – première et troisième ligne). Le nombre de défauts obtenus sur les structures produites à partir d'une pause de 5 ou 10 min semble contenir un nombre de défauts similaire. De même, les structures produites à partir d'une pause ou de deux pauses de 5 min semblent aussi contenir un nombre de défauts proche. Aucune différence marquée n'a été obtenue sur les structures traitées à un flux d'air humide à 80 ou 95%.

Les conditions testées ne semblent pas avoir permis d'améliorer les conditions de dépôt pour produire des structures plus épaisses. Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces résultats. La première serait que le flux d'air humide ne permet pas de décharger la surface ou en tout cas pas de manière efficace. Des temps d'exposition plus longs pourraient être envisagés mais cela engendrerait des temps d'impression, in fine, beaucoup plus longs. La deuxième hypothèse serait que la surface est déchargée de manière efficace mais que les filaments déposés après le traitement perturbent autant le champ électrique par l'ajout d'un nombre de charges électriques élevé.

Ces résultats sont néanmoins étonnants au vu des premières expériences qui semblaient montrer qu'une humidité plus importante de l'atmosphère du filage permettait de limiter l'apparition de défauts. Ces différentes tendances laissent alors suggérer que l'humidité présente dans l'air est capable de décharger efficacement les filaments au moment de leur dépôt, ce qui n'est pas le cas lorsqu'ils sont déjà présents sur le collecteur (plusieurs dizaines de secondes ou plusieurs minutes après le dépôt). La quantité de solvant au sein du filament qui évolue très rapidement dans les premiers instants qui suivent la formation du jet de polymère, pourrait être liée à ce phénomène. L'HFIP est un solvant polaire et miscible avec l'eau. Nous pourrions alors émettre l'hypothèse que l'humidité de l'air est capable d'interagir avec la surface et de décharger le jet de polymère lorsqu'il contient une quantité importante d'HFIP contrairement aux filaments déjà déposés qui en contiennent moins. En effet, les filaments déjà déposés sont peut-être trop hydrophobes pour interagir avec l'humidité de l'air est cedecharger de manière efficace.

#### 3.3.2 Influence d'un flux d'air ionisé sur la qualité de l'empilement

Une autre source de molécules chargées a été utilisée pour tenter de décharger la surface des structures. Avec un ioniseur d'air, la projection d'ions est réalisée grâce à une décharge électrique entre deux électrodes. La décharge permet de produire alternativement des ions positifs et des ions négatifs. Le déroulement d'une impression est le même que dans le cas de l'injection d'un air humide (Figure 3-12). Dans ce cas, le bulleur est enlevé du circuit d'alimentation reliant la pompe à l'ioniseur. Ainsi, pour ces essais, l'humidité est constante dans l'enceinte de l'imprimante. Elle a été fixée à 40% et la température est d'environ 20°C. Les images optiques des structures obtenues sont présentées en Figure 3-14.



Figure 3-14 Images optiques de structures de 50 ou 80 couches obtenues à partir d'une impression ponctuée de pauses afin de neutraliser les charges présentes sur les filaments déposés. Pour cela, un flux d'air ionisé a été utilisé. La barre d'échelle correspond à 500 μm.

Ces images correspondent aux structures réalisées sur une même journée. A chaque début d'expérience, un échantillon « contrôle » est réalisé qui correspond à une structure de 50 ou 80 couches sans pause. Le nombre de pauses ainsi que leur durée ont aussi été étudiés. Concernant les structures de 50 couches, une quinzaine de défauts sont visibles sur l'échantillon « contrôle » alors qu'environ 5 défauts sont visibles sur l'échantillon traité avec une pause de 5 min. L'échantillon traité avec une pause de 10 min comporte plus de filaments décalés mais très peu de défauts : environ 2-3. Il en est de même avec l'échantillon qui a été soumis à deux pauses de 5 min. Celui-ci comporte

beaucoup de filaments décalés sur toute la longueur mais seulement 2-3 filaments sont déviés au niveau de la grille. Ces résultats sont donc très encourageants, néanmoins, une tendance beaucoup moins marquée a été obtenue sur les structures composées de 80 couches. La structure « contrôle » et la structure produite à partir de deux pauses semblent comporter un nombre de défauts similaire. Les pauses ont été réalisées à la 40<sup>ème</sup> couche et à la 60<sup>ème</sup> couche. Dans ce cas, il est possible que la première pause ait été réalisée trop tardivement. Des défauts auraient alors pu commencer à apparaître avant, comme cela a été mis en évidence en partie 3.2.3. A 200 µm d'interligne, la structure atteint  $30 \pm 10$  couches sans défauts. L'enchaînement des pauses n'est donc certainement pas optimal dans ce cas.

Les résultats obtenus avec le traitement sous air ionisé sont assez encourageants. Dans le cas de la production de structures de 50 couches, l'air ionisé semble effectivement permettre de limiter l'apparition de défauts d'empilement pour toutes les conditions testées. De plus, le temps de pause entre 5 et 10 min et le nombre de pause entre 1 et 2 n'a pas semblé avoir d'influence sur le nombre de défauts.

Il serait intéressant de renouveler les essais afin de vérifier la répétabilité de ces résultats. Une optimisation de l'enchaînement des pauses pour la structure de 80 couches en commençant, par exemple, la première pause à la 25<sup>ème</sup> couche serait aussi nécessaire.

# 3.3.3 Influence de la polarité du champ électrique

Une dernière stratégie a été testée pour tenter de neutraliser la charge globale de la structure produite. Celle-ci consiste à utiliser une polarité positive et négative pour produire la structure. Lors de ces tests, des structures de 50 ou 80 couches ont été produites. Pour les structures de 50 couches, les 25 premières couches ont été produites avec une tension positive et les 25 dernières ont été déposées avec une tension équivalente négative. Pour la structure de 80 couches a été produite en alternant quatre fois 20 couches déposées avec une polarité positive et négative. La même aiguille a été utilisée pour produire les structures. Lors du changement de polarité, le câble d'alimentation haute tension a été connecté à une alimentation positive ou négative suivant la polarité désirée. Ainsi, la tension et donc le filage ont dû être coupés lors de chaque changement de polarité. Les images optiques des structures obtenues sont présentées en Figure 3-15.



Figure 3-15 Images optiques des structures de 50 ou 80 couches obtenues à partir d'une impression utilisant une polarité positive ou négative. La barre d'échelle correspond à 500 μm.

Les images présentées correspondent aux structures réalisées sur une même journée. Les échantillons « contrôle » correspondent à des structures réalisées sans pause avec une tension positive ou une tension négative (Figure 3-15 – première et deuxième colonnes). Dans le cas de structures de 50 couches, les structures « contrôle » obtenues présentent un nombre de défauts similaire quel que soit la polarité utilisée. Cela indique donc que la polarité n'a pas d'influence sur la quantité de défauts générés et donc sur le nombre de charges électriques. Le nombre de défauts obtenu sur la structure produite à partir des deux polarités semble présenter moins de défauts par rapport aux structures « contrôle ». Elle présente moins d'une dizaine de défauts au lieu d'une quinzaine de défauts obtenus sur les structures « contrôle ». Ces résultats sont encourageants, cependant une tendance différente a été obtenue sur les structures de 80 couches. La structure produite à partir des deux polarités présente un grand nombre de filaments côte à côte sur l'axe X à tel point que le collecteur n'est plus visible. Dans ce cas, la structure semble comporter beaucoup de défauts mais il est difficile de distinguer les filaments qui ont été décalés mécaniquement sur toute la longueur et les filaments qui ont été déviés au niveau de la grille. En effet, dans ce cas un nombre particulièrement important de décalages est apparu, il est donc difficile de tirer des conclusions.

Afin de confirmer la tendance obtenue avec les structures de 50 couches, de nouveaux essais devraient être réalisés. Dans l'idéal, ces structures pourraient être produites à partir de deux aiguilles différentes. Une reliée à une alimentation haute tension positive et l'autre reliée à une alimentation haute tension négative. Ainsi, une structure pourrait être produite à partir de deux polarités sans avoir à interrompre le filage ; ce qui représenterait un gain de temps.

# 4. Conclusion

Au cours de cette étude, plusieurs points ont pu être abordés à propos du dépôt localisé en électrofilage champ proche. L'optimisation des conditions de dépôt pour les solutions de PCL et de PLGA a d'abord été exposée dans une première partie. L'observation et la caractérisation des phénomènes associés au dépôt localisé en champ proche ont été effectuées dans une seconde partie. Enfin, différentes stratégies ont été mises en place pour tenter de neutraliser la charge de surface des structures et ainsi augmenter le nombre de couches sans défauts.

L'optimisation du dépôt localisé en champ proche a été effectuée en variant les paramètres comme la vitesse de déplacement du collecteur, la distance de travail, le débit d'extrusion et la concentration des solutions. Ces optimisations n'ont pas été particulièrement développées car il existe déjà un nombre important d'études à ce propos dans la littérature [144]. Les essais ont, par exemple, permis de confirmer l'influence de la vitesse de déplacement sur le motif d'enroulement du filament et son diamètre. Les résultats ont aussi montré l'influence de la distance de travail sur la vitesse du jet atteignant le collecteur et du débit d'extrusion sur le séchage du filament. Enfin, la concentration des solutions de polymère a été optimisée pour obtenir un filage stable, un filament suffisamment sec et des diamètres assez fins. L'ensemble de ces optimisations a finalement permis de produire des structures organisées à partir des deux solutions de PCL et de PLGA. Il s'agit de deux polymères intéressants pour l'ingénierie tissulaire. Le PCL est déjà largement utilisé en électro-impression mais, à ma connaissance, il s'agit de la première structure produite en PLGA. Des structures aux propriétés différentes pourraient alors être envisagées pour l'ingénierie tissulaire. Néanmoins, des différences ont pu être observées lors de la production de ces deux types de structures. Le jet de la solution de PCL est beaucoup plus stable sous champ électrique que le jet de la solution de PLGA. La solution de PCL a pu être filée en champ proche pendant presque 1 heure sans instabilités, ce qui n'a pas été le cas de la solution de PLGA. Les conditions pour lesquelles la solution est entièrement étirée par le champ électrique tout en évitant le multijet n'ont pas été déterminées. Ainsi, la structure a été produite avec un champ électrique assez faible provoquant l'apparition d'une goutte à la pointe de l'aiguille après quelques minutes de dépôt. Cela a pu provoquer une déviation du jet et une diminution de la résolution du dépôt (Annexe 11). Ce phénomène limite drastiquement l'utilisation de telles solutions pour l'électro-impression. Il serait alors intéressant d'approfondir l'étude en testant par exemple l'influence de la conductivité et la tension de surface des solutions de polymère sur la stabilité du filage.

Pour la caractérisation des empilements formés par dépôt localisé, seule la solution de PCL a été utilisée. Les résultats ont montré qu'à faible hauteur, les filaments déposés semblent être attirés par le haut de l'empilement de filaments déjà déposés plutôt que le collecteur. Ce phénomène sûrement lié à un effet de pointe, pourrait expliquer pourquoi il est possible d'empiler des filaments très fins de 2 à 5  $\mu$ m de diamètres alors que l'incertitude de repositionnement du collecteur n'est que de ± 20  $\mu$ m. A partir d'une certaine hauteur de structure, des défauts apparaissent dans l'empilement des filaments. Ces défauts correspondent à des filaments déviés de leur trajectoire lorsqu'ils atteignent la grille. Comme déjà mentionné dans un article de 2018 [106], ce phénomène est sûrement lié à une modification du champ électrique causé par l'accumulation de charges électriques à la surface des filaments. A partir d'une certaine hauteur et d'une certaine densité de polymère et de charges électriques, la grille écrante le collecteur ce qui perturbe le champ électrique et donc le dépôt localisé.

Afin de s'affranchir de cette limite, différentes stratégies ont été mises en place pour neutraliser les charges électriques présentes à la surface de la structure. La première a été de soumettre la structure

à un flux de molécules chargées. Pour cela, un air chargé en humidité et un air ionisé ont été utilisés. Les résultats ont montré que lorsqu'un air globalement plus humide est présent lors de l'impression, la présence de défauts d'empilement est diminuée de manière significative. L'air humide semble donc être capable de décharger une partie du jet de polymère et/ou du filament ainsi déposé. Cependant, aucune différence n'a été remarquée lorsqu'un air humide a été utilisé pour décharger la structure au cours de pauses incluses dans l'impression. Il semblerait alors que l'humidité soit capable de décharger le jet de polymère mais ne soit pas capable de décharger efficacement la surface de filament déjà déposé. Une quantité de solvant plus importante est présente dans le jet par rapport aux filaments déposés. Le solvant HFIP étant plutôt polaire et miscible avec l'eau, il donc possible que l'humidité ait tendance à s'adsorber plus facilement sur le jet et donc neutraliser les charges électriques plus efficacement. Une fois déposés, les filaments deviennent peut-être trop hydrophobes pour que l'humidité puisse s'adsorber en surface et éliminer les charges.

L'utilisation d'un air ionisé pendant des pauses semblerait avoir une influence sur la quantité de défauts sur les structures. Dans le cas de structures de 50 couches, l'ajout de pause a permis de réduire le nombre de défauts. Il faudrait néanmoins renouveler les tests car un nombre important de lignes décalées était aussi présent. Cette tendance n'a pas été observée pour des structures de 80 couches. Dans ce cas, L'enchaînement entre les différentes couches et les pauses n'était certainement pas optimal. La première pause a eu lieu à la 40<sup>ème</sup> couche alors que les défauts sont apparus à environ 30 couches lors de l'étude de l'influence de la densité. Il serait intéressant de vérifier par microscopie MEB si la pause à la 40<sup>ème</sup> couche a permis de corriger les défauts en dirigeant correctement le dépôt des filaments qui ont suivis. L'utilisation d'un flux d'air ionisé semble donc être une stratégie intéressante pour neutraliser une surface et limiter le nombre de défauts. Il serait intéressant de compléter cette étude par des analyses de surface par microscopie à sonde de Kelvin. Cette microscopie permettrait de mesurer le potentiel de surface des filaments et ainsi vérifier l'influence de l'air ionisé et de la hauteur de l'empilement sur la charge de surface. En parallèle de cette étude, d'autres essais ont été réalisés : un dépôt de 5 couches a été réalisé sur une lamelle de culture en plastique non traitée et sur une lamelle « ionisée » pendant plusieurs minutes. Les résultats ont montré que les filaments initialement déviés par une lamelle non traitée ne le sont plus sur une lamelle ionisée (Figure 3-16).



Figure 3-16 Images au microscope optique d'un dépôt de 5 couches sur une lamelle de culture non traitée et sur une lamelle de culture après avoir été soumise à un flux d'air ionisé pendant plusieurs minutes. La barre d'échelle correspond à 200 μm.

Ces tests préliminaires montrent donc l'intérêt certain de l'utilisation d'un air ionisé pour décharger une surface pour le dépôt en champ proche. Cette stratégie pourrait offrir la possibilité d'effectuer des dépôts localisés sur des collecteurs isolants et donc s'affranchir de la limite des propriétés électriques des collecteurs en électrofilage. Pour les tests biologiques, des structures pourraient par exemple être directement déposées sur des lamelles de culture.

La dernière stratégie utilisée pour neutraliser la charge globale de la structure est l'utilisation des deux polarités du champ électrique pour la production de filaments. Dans le cas d'une structure de 50 couches, l'utilisation de deux polarités semble avoir permis de diminuer le nombre de défauts. Moins d'une dizaine de défauts ont été obtenus au lieu d'une quinzaine sans changement de polarités. Cela n'a pas été confirmé avec des structures de 80 couches car beaucoup de décalages sont apparus. L'étude mériterait cependant d'être développée car cette stratégie est moins contraignante que les autres. Elle permettrait effectivement un gain de temps non négligeable pendant les impressions. L'idéal serait d'envisager deux aiguilles, l'une reliée à une tension positive et l'autre à une tension négative, qui seraient capables de se synchroniser pour déposer tour à tour les différentes couches avec une tension positive et négative. En allant plus loin, une alimentation à courant alternatif pourrait aussi être considérée ce qui permettrait de produire une structure de charge globale neutre sans avoir à alterner les couches de différentes origines. Une étude antérieure avait montré la possibilité d'utiliser un courant alternatif pour déposer localement en champ proche des filaments à partir d'une solution de PEO dans l'eau sur un support isolant [145]. Cette stratégie est intéressante mais elle doit certainement être limitée à l'utilisation de solutions peu visqueuses pour lesquelles la mobilité des charges électriques en solution est suffisamment élevée pour être coordonnée avec la fréquence d'alternance de la polarité du courant.

Afin d'adapter l'électro-impression à des applications d'ingénierie tissulaire, la suite de ce travail de thèse s'est consacrée à l'étude de l'influence du procédé d'électrofilage sur la conformation d'une protéine modèle.

# Chapitre 4

# Etude de l'évolution de la structure

secondaire d'une protéine électrofilée

# 1. Contexte et objectifs

L'intégration de protéines au sein de structures biomimétiques est un atout majeur pour l'ingénierie tissulaire. Naturellement, les protéines sont présentes dans les cellules et dans tout l'organisme. Elles assurent notamment l'organisation des tissus, la régulation et la communication intra et extracellulaire. Elles représentent donc des éléments clés à une régénération tissulaire efficace. C'est pourquoi, elles font souvent l'objet d'une attention particulière.





Les protéines sont des polypeptides composés d'un enchaînement d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques. L'activité d'une protéine repose souvent sur sa conformation spatiale. La conformation d'une protéine est organisée selon quatre niveaux : la structure primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire (Figure 4-1). La structure primaire d'une protéine correspond à la nature chimique de l'enchaînement de ses acides aminés. La structure secondaire correspond au repliement qu'adopte localement la chaîne de polypeptide. Celle-ci dépend directement de la nature chimique et de l'interaction des acides aminés entre eux. Ces interactions peuvent être à l'origine de liaisons ioniques, d'effets hydrophobes, de liaisons hydrogènes ou de ponts disulfures. Deux repliements principaux peuvent être adoptés par la chaîne de polypeptide : hélice  $\alpha$  et feuillet  $\beta$ . La structure tertiaire ou tridimensionnelle se rapporte enfin à l'organisation spatiale des structures secondaires entre elles. Il s'agit de la structure permettant à la protéine une reconnaissance anticorps-antigène. C'est donc ce qui lui procure son activité biologique. Si celle-ci est modifiée, l'activité de la protéine a de grandes chances de l'être aussi. La dernière structure, quaternaire, correspond à l'assemblement de plusieurs chaînes dans le cas où la protéine est composée de plusieurs polypeptides.

Les protéines sont souvent considérées comme des

molécules sensibles car leur structure tridimensionnelle repose sur un équilibre d'interaction présent entre les différents acides aminés qui la composent. A la moindre perturbation de ces interactions, la protéine peut se restructurer et perdre son activité. L'encapsulation de protéines pour le développement de matériaux pour le biomédical étant un sujet d'actualité, de nombreuses études ont été menées sur l'encapsulation et la protection de protéines au sein de micro- ou nanoparticules de polymères [146]. Néanmoins, encore peu d'études existent sur le comportement de protéines en électrofilage. Pourtant, un nombre important de paramètres peuvent perturber la structure de la protéine en électrofilage : le solvant organique, le polymère résorbable hydrophobe, le champ électrique et l'étirage mécanique. Une partie des travaux effectués au cours de cette thèse s'est alors consacrée à l'étude de la structure d'une protéine en fonction de l'environnement qu'elle peut rencontrer pendant le procédé d'électrofilage. L'objectif est, in fine, de trouver une stratégie permettant d'introduire des protéines dans les filaments tout en conservant leur activité biologique.

Pour cette étude, le dichroïsme circulaire (DC) a été choisi pour analyser la structure des protéines [147]. Il s'agit d'une technique spectrophotométrique capable d'analyser toute molécule chirale - comme les protéines - à partir d'une lumière polarisée. Les liaisons peptidiques des protéines absorbent différemment la lumière en fonction de sa polarisation, ce qui produit un signal de DC dans l'UV lointain (180 à 260 nm). Ainsi, lorsque les interactions, et donc l'orientation, entre acides aminés évoluent au sein de la protéine, le signal de DC évolue aussi. C'est pourquoi, le DC est souvent utilisé pour évaluer la structure secondaire des protéines en solution. Les facteurs de croissance utilisés dans le Chapitre 5 étant très coûteux, une protéine modèle a été utilisée pour cette étude. Il s'agit de l'albumine de sérum bovin (BSA). La BSA ne présentant pas d'activité biologique particulière, seule sa structure secondaire a été analysée.

Dans la littérature, le « blend electrospinning » et le « coaxial electrospinning » sont deux techniques d'électrofilage souvent utilisées dans le cas où des biomolécules doivent être intégrées dans les filaments [148], [149]. La première technique (blend electrospinning) a pour stratégie d'intégrer la protéine dans un mélange de polymère résorbable et de polymère hydrophile non résorbable mais biocompatible comme le poly (éthylène glycol) (PEG) ou le poly (acétate de vinyle) (PVA). Le PEG et le PVA sont effectivement deux polymères utilisés comme excipients pour ces applications car ils sont connus pour stabiliser et limiter l'interaction des protéines avec les polymères résorbables qui peuvent induire leur adsorption, agrégation ou leur dénaturation [150], [151]. La seconde technique (coaxial electrospinning) a pour but de préserver la protéine en utilisant un système d'aiguilles coaxiales. Il s'agit de deux aiguilles concentriques respectivement alimentées par des deux solutions. Ainsi, des filaments à la structure cœur-coquille peuvent être produits. Dans ce cas, la protéine peut être protégée du polymère résorbable et du solvant organique en étant placée au cœur du filament. La protéine peut ainsi être encapsulée dans un matériau non agressif comme une solution aqueuse de polymère hydrophile (PEG ou PVA). Dans le but d'utiliser la meilleure stratégie permettant de conserver la structure et donc l'activité des protéines après électrofilage, des tests ont été réalisés sur ces différentes conditions d'électrofilage. Le copolymère résorbable PLGA qui est beaucoup utilisé pour encapsuler des agents bioactifs, a été utilisé pour cette étude. Celui-ci a été utilisé seul ou dans un mélange avec du PEG à 10 ou 30%. Le PEG a été choisi car il s'agit d'un polymère aussi beaucoup utilisé pour stabiliser la protéine. Des filaments ont aussi été produits à partir d'une aiguille coaxiale alimentée par une solution de PLGA (coquille) et de PEG (cœur). A ma connaissance, seule une étude de 2011 avait aussi utilisé le DC pour analyser la structure d'une protéine après électrofilage [149]. Néanmoins, la protéine avait été électrofilée sans polymère résorbable ce qui ne correspond pas aux conditions normalement utilisées. Dans le cas de cette thèse, la BSA a été filée dans des conditions classiques d'électrofilage.

Cette étude a été divisée en cinq parties. Après avoir caractérisé la structure native de la BSA dans l'eau, l'influence du solvant organique HFIP (utilisé jusqu'à présent pour dissoudre le PLGA) sur la structure de la BSA a été étudiée. La partie suivante s'est ensuite consacrée à l'étude de l'influence des polymères PLGA et PEG en solution sur la BSA. Enfin, la structure de la BSA a été caractérisée après avoir été filé avec le PLGA, un mélange PLGA/PEG ou à partir d'une aiguille coaxiale. En complément, la cinétique de libération de la BSA dans l'eau à partir des filaments a aussi été étudiée.

# 2. Matériel et méthode

# 2.1 Composés

L'acide poly(lactique-co glycolique) (PLGA) avec 85% de monomère acide lactique et 2,3 dL/g de viscosité inhérente a été acheté chez CORBION. Il s'agit du polymère utilisé dans les Chapitres 2 et 3 et dont la masse molaire déterminée par chromatographie d'exclusion stérique est de 410 kDa. Le poly(éthylène glycol) (PEG) de masse molaire 35 kDa a été acheté chez Sigma Aldrich. Le solvant organique 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) utilisé pour dissoudre le PLGA a été acheté chez TCI. L'eau utilisée pour les essais est de l'eau désionisée de conductivité 18,2 MΩ.cm. L'albumine de sérum bovin, la BSA, a été achetée chez Sigma Aldrich sous forme lyophilisée. La BSA fluorescente conjuguée à un Alexa Fluor 488 a été achetée chez ThermoFisher, également sous forme lyophilisée.

# 2.2 BSA en solution

Afin de déterminer l'influence du solvant et des différents polymères utilisés sur la structure secondaire de la BSA, plusieurs solutions ont été préparées. La BSA a d'abord été introduite dans de l'eau ou de l'HFIP et a ensuite été préparée avec différentes concentrations en PEG et en PLGA (Tableau 4-1). La concentration en PEG varie ici de 0,01 g/mL à 0,1 g/mL, soit de 1% à 10%. La concentration en PLGA varie de 10<sup>-5</sup> g/mL à 10<sup>-4</sup> g/mL, soit de 0,001% à 0,1%.

Tableau 4-1 Concentrations en polymères PEG et PLGA des différentes solutions utilisées pour les analyses de dichroïsme circulaire.

Polymère	Solvant	Concentration		
PEG	Eau	1%	5%	10%
PEG	HFIP	1%	5%	10%
PLGA	HFIP	0,001%	0,01%	0,1%

Dans le cas où la BSA est directement ajoutée à la solution de PLGA, la solution devient opaque, signe d'hétérogénéité du mélange. La BSA ne se dissout pas dans l'HFIP, même sous agitation pendant 24h à 37°C. Afin d'introduire la BSA de manière homogène dans la solution contenant l'HFIP, celle-ci a d'abord été solubilisée dans un minimum d'eau. La quantité d'eau dans les solutions finales de BSA dans l'HFIP reste assez faible, entre 0,05 et 0,2%. Lorsque la solution de polymère est homogène après une nuit sous agitation, la solution de BSA y est ajoutée pour obtenir une solution finale à 0,05 mg/mL en BSA.

# 2.3 Essais d'électrofilage

Quatre conditions d'électrofilage ont été utilisées pour filer la BSA. Celle-ci a été filée avec du PLGA (1) ou un mélange de PLGA-PEG avec 10% de PEG (2) ou 30% (3). Pour la dernière condition (4), la BSA a été filée à l'aide d'une aiguille coaxiale dont les diamètres internes des deux aiguilles concentriques sont respectivement 0,178 mm et 0,508 mm. Les différentes concentrations de PLGA, PEG et BSA utilisées sont indiquées dans le Tableau 4-2. La concentration de BSA a été adaptée pour qu'après dissolution des filaments, la concentration de BSA soit de 0,05 mg/mL et que la concentration de PLGA soit de 0,1%. Ces concentrations ont été fixées pour retrouver des concentrations similaires aux

solutions de la partie 2.2, et pouvoir ainsi conclure sur l'influence du procédé d'électrofilage sur la protéine.

Conditions		(2) Mélange	(3) Mélange	(4) Coaxial
Conditions	(I) PLOA	PLGA+10%PEG	PLGA+30%PEG	PLGA/PEG
Concentration	0.09 (HEIP)	0.09 (HEIP)	0.09 (HEIP)	0 13 (HEIP)
PLGA (g/mL)	0,05 (1111)	0,05 (1111)	0,05 (1111)	0,15 (1111)
Concentration	1			0.1 (Equ)
PEG (g/mL)	/	0,010 (HFIP)	0,039 (ППР)	0,1 (Edu)
Concentration	1 E	<b>1</b> E	<b>1</b> E	10 E (Equ)
BSA (mg/mL)	4,5	4,5	4,5	19,5 (Edu)
Distance de	10	10	10	11
travail (cm)	10	10	10	11
Débit (mL/h)	1,0	1,0	1,0	0,5 /0,12
				(PLGA/PEG)
Tension (kV)	4,8	4,5	4,7	4,9

Tableau 4-2 Concentrations des solutions de PEG et PLGA utilisées et conditions d'électrofilage.

Les essais d'électrofilage ont été réalisés dans des conditions optimisées en termes de distance de travail, débit et tension (Tableau 4-2). Après production, les filaments ont été séchés pendant 6 jours à 40°C. Ce protocole de séchage a été mis au point afin d'éliminer les traces de solvant HFIP. Cette optimisation rentre dans le cadre de la préparation des échantillons destinés à être testés en culture cellulaire et sera mieux détaillé dans la première partie du Chapitre 5.

La morphologie des filaments a ensuite été caractérisée par microscopie électronique à balayage (MEB) de marque ZEISS Merlin Compact. Un microscope confocal Zeiss (LSM 800) a aussi été utilisé pour caractériser la structure cœur-coquille des filaments produits à partir de l'aiguille coaxiale. Pour cela, de la BSA couplée à un fluorophore a été introduite dans la solution de cœur selon une concentration de 0,5 mg/mL. Un laser à 488 nm a été utilisé pour illuminer l'échantillon.

# 2.4 Dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été réalisés à partir d'un spectrophotomètre Chirascan de Applied Photophysics. Cette étude a été réalisée à l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP, UMS 3760, Université Claude Bernard Lyon 1), en collaboration avec Dr. Roland Montserret. Un minimum de 300  $\mu$ L de solution a été analysé dans des cuves de 2 mm d'épaisseur. Les spectres ont été acquis de 260 à 180 nm. En cas de saturation du signal, les spectres ont été rognés. Pour chaque condition analysée en présence de BSA, un échantillon référence sans BSA a été préparé et analysé. Au regard du nombre de conditions de filage étudié, ce sont donc quatre autres types de filaments qui ont été produits sans BSA. Le spectre de référence a ensuite été systématiquement soustrait à celui de l'échantillon contenant de la BSA.

Après acquisition, les spectres ont été traités. La gamme de longueurs d'onde du spectre a souvent été ajustée vers 190 nm à cause de la saturation du signal. Par la suite, les spectres ont été lissés en moyennant les mesures de l'intensité du signal sur 20 à 30 points. A partir des spectres obtenus, il est possible d'évaluer la proportion des éléments (ou types) de la structure secondaire de la protéine comme les hélices  $\alpha$  et les feuillets  $\beta$ . Chacun de ces éléments purs présente un spectre de DC caractéristique (Figure 4-2).



Figure 4-2 Spectres de dichroïsme circulaire caractéristiques des différents types de structure secondaire d'une protéine [147]. Ligne continue : hélice α ; Grands tirets : feuillet β ; Ligne en pointillé : coudes ; Ligne barrée : hélice poly pro de type collagène ; Petits tirets : déstructuré.

Des logiciels en ligne comme Bestsel ou DichroWEB sont capables de traiter les spectres et d'évaluer la proportion de chaque élément de la structure secondaire d'une protéine en se basant sur différents algorithmes. Pour réaliser ce traitement, il est important de connaître de manière précise la concentration de la protéine dans la solution analysée. Effectivement, l'intensité du signal obtenu en DC est proportionnelle à la concentration de la protéine, il est alors important de normaliser les spectres. Le NanoDrop<sup>TM</sup> peut être utilisé pour déterminer la concentration de la protéine en solution aqueuse. Il ne peut donc pas être utilisé pour l'ensemble des solutions testées, notamment celles qui contiennent de l'HFIP. Les spectres ont tout de même pu être comparés en se basant sur des rapports d'intensités relatives de pics. La BSA est connue pour présenter une grande partie de sa structure secondaire en forme d'hélice  $\alpha$  où les pics caractéristiques sont à environ 191, 208 et 222 nm (Figure 4-2). Le signal de DC à ces longueurs d'ondes a alors été utilisé pour déterminer les rapports d'intensité du signal suivants:

Signal DC <sub>191</sub>
Signal DC <sub>208</sub>
Signal DC <sub>208</sub>
Signal DC <sub>222</sub>

# 2.5 Spectrophotomètre à microvolume NanoDrop<sup>™</sup>

Un spectrophotomètre UV-Visible NanoDrop<sup>™</sup> 2000 (Thermo Scientific) a été utilisé pour déterminer la concentration de la BSA dans l'eau selon l'absorbance de la solution à 280 nm. Pour les analyses, 2 µL de solution ont été utilisés. La mesure de l'absorbance est effectuée trois fois sur trois prélèvements différents. La concentration est ensuite déterminée à partir de l'absorbance moyenne suivant la loi de Beer-Lambert (Equation 1 et 2) :

 $A = \epsilon.I.C$ 

Equation 1

$$C = \frac{A.M}{\varepsilon.l}$$

Equation 2

- C : concentration de la BSA (en g.L<sup>-1</sup> ou mg.mL<sup>-1</sup>)
- M : masse molaire de la BSA qui est de 66432.96 g.mol<sup>-1</sup>
- A : absorbance de la solution aqueuse à 280 nm
- $\epsilon$  : coefficient d'extinction molaire à 280 nm de la BSA dans l'eau (42925 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>)
- I : longueur du trajet optique (ici de 1 cm).

# 3. Résultats et discussion

Les analyses en DC ont été réalisées afin de connaître l'influence du solvant organique HFIP, du polymère PEG, du PLGA et du procédé d'électrofilage sur la structure secondaire de la BSA.

#### 3.1 Caractérisation de la BSA dans l'eau

Le spectre de DC de la BSA dans l'eau et le spectre de l'eau seule sont présentés en Figure 4-3-(a). L'eau seule ne présente pas de signal de DC mais a tendance à faire saturer le signal de DC vers 183 nm. La saturation est caractérisée par un pic intense. Ainsi en deçà de 183 nm, après le pic de saturation, plus aucun signal n'est récupéré. Après soustraction du spectre référence, le spectre traité de la BSA dans l'eau est alors réduit de 183 à 260 nm puis lissé en moyennant le signal sur 20 à 30 points de mesure (Figure 4-3-(b)). Le spectre présente un pic de signal positif vers 190 nm et deux pics d'intensité négative vers 208 et 222 nm, caractéristiques d'un repliement majoritairement en hélice  $\alpha$ .



Figure 4-3 Spectre de DC de la BSA dans l'eau. (a) Spectres bruts de la BSA dans l'eau (bleu) et de l'eau (orange). (b) Spectre traité de la BSA dans l'eau. (c) Détermination des proportions des structures secondaires de la BSA à partir de quatre algorithmes et leur moyenne.

La concentration de la protéine dans la solution a été déterminée par NanoDrop<sup>™</sup> : celle-ci est de 0,05 mg/mL. Pour cette concentration, un rapport signal sur bruit satisfaisant a été obtenu. Ainsi pour la suite de l'étude, cette concentration a été maintenue constante pour les différentes conditions testées. A partir du spectre de la BSA et de la valeur de sa concentration, la proportion des différents types de structures secondaires de la BSA dans l'eau a été déterminée grâce au logiciel en ligne DichroWEB. Le logiciel détermine la proportion de chaque structure secondaire à partir de quatre algorithmes. Les valeurs obtenues à partir des algorithmes sont assez proches, ce qui montre la fiabilité

de ces résultats. Une moyenne a alors été calculée pour chaque structure secondaire. La BSA est majoritairement repliée en hélice  $\alpha$  qui correspond à 62% de sa structure. Cette valeur est proche de ce qui se trouve dans la littérature : 67% d'hélice  $\alpha$  est généralement obtenu [152].

# 3.2 Influence du solvant HFIP

Les spectres de la BSA dans l'eau et l'HFIP ont été obtenus après soustraction des spectres références de l'eau et de l'HFIP sans protéine (Figure 4-4-(e)). Le solvant HFIP ne présente pas de signal de DC et aucun pic de saturation n'est observé dans la gamme analysée de 180 à 260 nm. Les spectres traités de la BSA dans l'eau et l'HFIP sont présentés en Figure 4-4-(a). Les deux spectres suivent la même tendance mais il est possible d'observer quelques différences. Le spectre de la BSA dans le HFIP, par rapport à celui de la BSA dans l'eau, possède une intensité plus faible pour le pic à 190 nm et une intensité plus importante (valeur négative) pour le pic à 208 nm. L'intensité du pic à 222 nm ne semble que peu modifiée par le changement de solvant. Les différences de rapport de signal sont de 28% pour le rapport à 191 et 208 nm et de 24% pour le rapport à 208 et 222 nm (Figure 4-4-(c)). Un écart type sur les valeurs de rapport a été calculé à partir de deux spectres différents obtenus pour la BSA dans l'eau et dans l'HFIP. L'écart type du rapport du signal à 191 et 208 nm pour la BSA dans l'HFIP est assez important, ce qui rend incertain la différence entre les rapports de la BSA dans l'eau et dans l'HFIP. Cependant, la différence des rapports du signal à 208 et 222 nm semble significative. L'augmentation de l'intensité du pic négatif à 208 nm pourrait s'expliquer par une augmentation de la proportion de feuillet  $\beta$  qui présente aussi un pic négatif vers 210 nm (Figure 4-2). Ces résultats montrent donc que le solvant organique HFIP peut induire une légère modification de la structure secondaire de la BSA.

Une autre analyse a permis de vérifier si la modification de conformation de la protéine induite par l'HFIP est réversible. Pour cela, la BSA a été placée dans 90% d'HFIP et 10% d'eau en même temps que l'échantillon de BSA dans l'HFIP dont le spectre est présenté en Figure 4-4-(a). La BSA a ensuite été introduite dans l'eau par dilution quelques minutes avant l'analyse. Lors de l'analyse, la BSA est dans un milieu composé à 83% d'eau et 17% d'HFIP. Les spectres de la BSA dans l'eau et de la BSA dans l'eau après avoir été mise en contact avec l'HFIP sont présentés en Figure 4-4-(b). Les deux spectres suivent parfaitement la même tendance. Seule une légère différence d'intensité des spectres existe qui peut être témoin d'une différence de concentration en protéine. La similarité des deux spectres est confirmée par des rapports de signal qui sont, eux aussi, presque égaux (Figure 4-4-(d)). Les rapports à 191 et 208 nm sont différents de seulement 6% et les rapports à 208 et 222 nm sont différents de moins de 1%. La modification que peut potentiellement induire l'HFIP sur la BSA est donc un phénomène qui est en grande partie réversible lorsque la protéine est réintroduite dans l'eau.



Figure 4-4 Influence de l'HFIP sur la structure de la BSA. (a) et (c) Spectres de DC de la BSA dans l'eau et dans l'HFIP et rapport de signal à 191 et 208 et à 208 et 222 nm. (b) et (d) Spectres de dichroïsme circulaire de la BSA dans l'eau et de la BSA dans l'HFIP et diluée dans l'eau à 83% quelques minutes avant l'analyse et rapport de signal à 191 et 208 et à 208 et 222 nm. (e) Spectres bruts de la BSA (spectre bleu) et du solvant seul (spectre orange) pour les solutions dans l'eau et dans l'HFIP.

# 3.3 Influence du polymère

L'influence du PEG et du PLGA sur la structure secondaire de la BSA en solution a été étudiée.

Influence du PEG

Le PEG est un polymère hydrophile soluble autant dans l'eau que dans l'HFIP. Etant utilisé dans les deux solvants lors des tests d'électrofilage (Tableau 4-2), il a donc aussi été analysé en DC dans les deux solvants en présence de BSA. Les concentrations en PEG utilisées sont de 1, 5 et 10 %. Ces concentrations ont été choisies car elles sont assez proches des concentrations des solutions utilisées en électrofilage (Tableau 4-2). La concentration en BSA a été fixée à 0,05 mg/mL. Seul le rapport du signal obtenu à 208 et 222 nm a été utilisé pour comparer les spectres entre eux car le PEG a tendance à faire saturer le détecteur vers les faibles longueurs d'onde et notamment vers 191 nm (Figure 4-5-(e)) Le pic de saturation imposé par la présence de PEG se déplace vers les longueurs d'onde élevées avec une augmentation de sa concentration dans la solution. Pour une même concentration, l'absorption du PEG s'effectue à une longueur d'onde plus faible dans l'HFIP que dans l'eau, au point de ne pas apparaître pour 1% de PEG dans l'HFIP. Hormis la présence de pic de saturation, le PEG ne présente pas de signal de DC.

Les spectres de la BSA dans l'eau en présence de PEG à différentes concentrations sont présentés en Figure 4-5-(a). Les spectres présentent des tendances très similaires. Les rapports de signal sont aussi très similaires : la différence par rapport à la structure native de la BSA dans l'eau est entre 0,2% et 5% (Figure 4-5-(c)). L'écart-type sur les valeurs de rapport de signal a été calculé sur deux spectres différents. L'écart-type le plus élevé a été obtenu sur l'échantillon contenant 10% de PEG et correspond à 7% du rapport obtenu sur la BSA dans l'eau. Il semblerait donc que les variations obtenues sur les rapports de signal ne soient pas significatives. La présence de PEG en solution aqueuse jusqu'à 10% ne semble donc pas induire (ou très peu) de modifications de la structure secondaire de la BSA.

Les spectres de la BSA dans l'HFIP en présence de PEG à 1, 5 et 10% sont présentés en Figure 4-5-(b). Les spectres suivent aussi la même tendance que celle observée pour les solutions dans l'eau. Les rapports de pics à 208 et 222 nm sont très proches : la différence du rapport entre la BSA dans l'HFIP seul ou en présence de PEG varie de 0,1 pour 10% de PEG et de 6% pour 1% PEG (Figure 4-5-(d)). Cette fois, l'écart-type n'a pas pu être calculé sur tous les échantillons. Seul l'écart-type obtenu en partie 3.2 a été reporté. Il correspond à 10% du rapport de signal obtenu pour la BSA dans l'HFIP. Les différences de rapport obtenues étant inférieures à l'écart-type, les variations entre les rapports ne sont donc sûrement pas significatives. Les rapports de signal à 191 et 208 nm ont aussi pu être calculés pour la BSA dans l'HFIP et la BSA dans l'HFIP-PEG1%. Ils sont respectivement de 2,0 et 1,5 ce qui correspond à 25% de différence. Bien qu'élevée cette différence reste inférieure à l'écart-type obtenu pour la BSA dans l'HFIP qui est de 33%. Le PEG n'induirait donc pas plus de modification de structures secondaires de la BSA par rapport à l'HFIP seul.

Ces résultats confirment ce qui a été trouvé dans la littérature sur la structure secondaire de lysozyme en présence de 10% de PEG à 1000 Da dans l'eau [153]. Dans ce cas non plus, le spectre DC de la protéine n'avait pas été modifié en présence de PEG. Dans cette étude, il a aussi été remarqué que la protéine avait tendance à interagir préférentiellement avec le solvant plutôt que le PEG. Les charges électriques présentes sur la protéine ont effectivement tendance à rendre défavorable l'interaction PEG-protéine. L'absence d'interaction est d'ailleurs la raison pour laquelle le PEG a une action stabilisante sur la protéine [154]. Il n'est en revanche pas possible, dans cette étude, d'affirmer que le PEG joue un rôle de protecteur de la protéine vis-à-vis du PLGA comme cela est avancé dans la littérature [150], [154].



Figure 4-5 Influence du PEG sur la structure de la BSA. (a)(c) Spectres de DC de la BSA dans l'eau et PEG à différentes concentrations et rapports de signal à 208 et 222 nm. (b)(d) Spectres de DC de la BSA dans l'HFIP et PEG à différentes concentrations et rapport

Influence du PLGA

Le PLGA a été dissous dans l'HFIP en présence de BSA selon des concentrations de 0,001%, 0,01% et 0,1%. Ces concentrations sont de 100 à 10 000 fois plus faibles que les concentrations utilisées en électrofilage (Tableau 4-2) car cette gamme a dû être adaptée en fonction des limites expérimentales. Effectivement, le PLGA présente un signal de DC important dont le maximum se trouve vers 210 nm. Il se trouve donc proche des pics caractéristiques du spectre de la BSA à 208 et 222 nm (Figure 4-6-(c)).

En présence de 0,1% de PLGA, le signal DC du polymère devient prédominant, ce qui rend le spectre obtenu très différent comparativement aux trois autres spectres. Au-delà de 0,1% de PLGA, le signal de DC est très rapidement saturé et aucun spectre de BSA ne peut être exploité.

Comme précédemment, la concentration en BSA a été fixée à 0,05 mg/mL dans chaque solution. Les spectres correspondants à ces différentes conditions sont présentés en Figure 4-6-(a). Les spectres de la BSA dans l'HFIP et en présence de PLGA à 0,001% ou 0,01%, ont une allure globale similaire. Les différences de rapports d'intensité des pics caractéristiques présentent les mêmes tendances (Figure 4-6-(b)). La différence de rapport à 191 et 208 nm est de 9% pour le PLGA à 0,001% et 5% pour le PLGA à 0,01%. La différence de rapport à 208 et 222 nm est de 2% pour le PLGA à 0,001% et 1% pour le PLGA à 0,01%. Une différence plus marquée est présente entre les spectres et les rapports obtenus entre la BSA dans l'HFIP et la BSA dans l'HFIP en présence de 0,1% de PLGA : 37% de différence pour le rapport à 191 et 208 nm et 12% de différence pour le rapport à 208 et 222 nm. Ces différences sont importantes mais elles restent tout de même inférieures ou proche de l'écart type obtenu sur les spectres de la BSA dans l'HFIP. Celui-ci correspond à 50% du rapport du signal à 191 et 208 nm et à 9% du rapport à 208 et 222 nm. Ainsi, il n'est pas possible d'affirmer que les différences observées sur les spectres soient significatives et que la présence de PLGA jusqu'à 0,1% induisent des modifications structurales significatives de la BSA.



Figure 4-6 Influence du PLGA sur la structure de la BSA. (a) Spectres de DC de la BSA dans l'HFIP et en présence de PLGA à 0.001%, 0.01% et 0.1%. (b) Rapport du signal de DC à 191 et 208 nm et à 208 et 222 nm pour les différentes conditions testées (les \* indiquent les valeurs de rapport pour lesquels un écart-type n'a pas pu être défini). (c) Spectres bruts de la BSA (spectre bleu) et de la solution référence (spectre orange) pour les différentes conditions testées.

Une concentration à 0,1% de PLGA dans l'HFIP correspond à une solution en régime dilué (C.K.M<sub>w</sub><sup>a</sup> = 0,2 Chapitre 2, Figure 2-11, page 48) alors que la concentration de PLGA utilisée en électrofilage d'environ 10%, correspond à une solution en régime enchevêtré (C.K.M<sub>w</sub><sup>a</sup> = 20 Chapitre 2, Figure 2-11, page 48). En régime dilué très peu d'interactions existent entre les chaînes de polymère et donc avec la BSA alors qu'en régime enchevêtré, des interactions existent sûrement entre les chaînes de polymère et la BSA. Ainsi, les concentrations testées ne sont sûrement pas représentatives des conditions que subit réellement la protéine lors des essais en électrofilage. Ces essais ont tout de même permis de définir les conditions expérimentales pour la suite de l'étude : afin d'exploiter les spectres de la BSA en présence de PLGA de manière fiable, la concentration de PLGA ne doit pas dépasser 0,1%. Ainsi, pour la suite de l'étude, la concentration du polymère en solution a été fixée à 0,1%.

# 3.3 Influence de l'électrofilage

L'influence du procédé d'électrofilage sur la structure de la BSA a été étudiée selon différentes conditions d'électrofilage afin de pouvoir, à terme, choisir celle qui permettrait de préserver au mieux l'activité de la protéine et sa structure secondaire. Le PEG a été mélangé avec le PLGA selon deux ratios PLGA-PEG, et la répartition du PEG dans le filament a été ajustée par l'utilisation d'un mélange simple de polymères ou d'une aiguille coaxiale. Voici les différentes conditions testées :

- Filaments de PLGA
- Filaments de PLGA et 10% de PEG (mélange)
- Filaments de PLGA et 30% de PEG (mélange)
- Filaments de PLGA et PEG produit à partir d'une aiguille coaxiale

Les conditions utilisées pour l'électrofilage ont été présentées en partie 2.3. L'influence du procédé d'électrofilage sur la structure secondaire de la BSA a été étudiée par DC selon deux stratégies. La première a été d'analyser la structure de la BSA au sein du filament. Pour cela, les filaments contenant la BSA ont été dissous dans le solvant organique HFIP puis analysés en DC. La seconde stratégie a consisté à analyser la structure de la BSA lorsqu'elle est libérée des filaments. Pour cela, les filaments ont été incubés dans de l'eau déionisée pendant plusieurs jours à 37°C sous légère agitation. Le milieu aqueux dans lequel les filaments ont été incubés a ensuite été analysé en DC. Avant de présenter les résultats obtenus par DC, la morphologie des différents types de filaments est d'abord présentée.

Morphologie des filaments

La morphologie des filaments électrofilés a été caractérisée par MEB. Il a été intéressant de remarquer que les filaments pouvaient adopter un diamètre et une morphologie de surface différents lorsqu'ils contiennent ou non la protéine BSA (Figure 4-7, Tableau 4-3).

Tableau 4-3 Moyenne des diamètres (en micromètre) mesurés sur une dizaine de zones différentes pour les différentes conditions d'électrofilage.

	PLGA	PLGA + PEG10%	PLGA + PEG30%	COAX PLGA/PEG
Sans BSA	2,0 ± 0,2	1,9 ± 0,1	2,5 ± 0,6	1,6 ± 0,2
Avec BSA	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,3	1,4 ± 0,4	1,3 ± 0,2

Les filaments contenant la BSA sont généralement plus fins par rapport aux filaments qui n'en contiennent pas (Tableau 4-3). La différence de diamètre est presque de 1  $\mu$ m entre les filaments avec et sans BSA. La protéine semble donc avoir une influence sur la taille des filaments et donc sur leur étirage lors du procédé d'électrofilage. Les protéines sont des molécules pouvant être chargées

électriquement. La BSA possède effectivement presque un quart de ses acides aminés qui comportent des fonctions chimiques latérales comme des carboxyliques ou des amines (Séquence d'acide répertoriée sur la programme ProtParam, P02769). En électrofilage, il est connu que l'ajout de molécules chargées comme des sels au sein des solutions permet d'augmenter la conductivité des solutions et donc leur étirage sous champ électrique. Cela expliquerait donc pourquoi l'ajout de BSA induit la diminution du diamètre des filaments. De plus, la réduction de diamètre de filament a déjà été expliqué par la présence de BSA en solution dans un article de 2004 [155] : des filaments dextran de 500 nm de diamètre avaient été obtenus en présence de 5% de BSA alors que des filaments de 2,5 µm de diamètre avaient été obtenus sans protéine. La différence de diamètre est moins marquée pour les filaments produits à partir de l'aiguille coaxiale : les filaments contenant la BSA mesurent 1,3 ±0,2 µm de diamètre alors que les filaments sans BSA mesurent 1,6 ±0,2 µm de diamètre. Dans le cas des filaments à la structure cœur-coquille, le phénomène est sûrement moins marqué car on s'attend à ce que la protéine soit isolée au cœur du filament. Les charges électriques étant localisées au cœur, l'étirage est donc sûrement moins important dans ce cas.



Figure 4-7 Images MEB obtenues des différents filaments produits par électrofilage avec et sans BSA (barre d'échelle : 1 μm) et image confocale d'un filament produit à partir d'aiguilles coaxiales en intégrant de la BSA marquée fluorescente.

La morphologie de surface des filaments est aussi modifiée lorsque la BSA est introduite dans les solutions, surtout dans le cas de filaments de PLGA et de mélange PLGA et 10% de PEG. La surface des filaments sans BSA est complètement lisse alors qu'avec BSA, des nodules d'une centaine de nanomètres sont présents à la surface des filaments (Figure 4-7). Ces nodules ont la forme d'ellipsoïde allongé dans le sens d'étirage des filaments. On pourrait émettre l'hypothèse que ces nodules correspondent à des agrégats de BSA formés au sein des filaments. Ces résultats expliqueraient pourquoi lorsque les solutions transparentes et homogènes de BSA dans l'HFIP et de PLGA (seul ou avec PEG) dans l'HFIP sont mélangées ensemble, deviennent blanches et opaques. Afin de confirmer ces hypothèses, une analyse de surface des filaments par spectrométrie de masse à ionisation ToF-SIMS (*Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry*) est envisagée. Cette technique permettrait de vérifier si la BSA est située préférentiellement à la surface des filaments. Il serait aussi intéressant d'observer ces mêmes filaments après avoir été incubés dans de l'eau. Si les nodules correspondent à de la BSA qui est soluble dans l'eau, alors ils devraient disparaître après incubation.

Une distribution non homogène de la BSA dans les filaments, peut induire différentes problématiques comme une libération non linéaire au cours du temps, ou sa dénaturation liée à son agrégation. La distribution de protéines dans des filaments de PLGA avait été caractérisés par MET dans une étude de 2009 [156]. L'image présentée dans l'article montre aussi la présence d'agrégats au sein des filaments de PLGA. L'image ne montre pas si la BSA est localisée en surface mais les résultats obtenus sur les valeurs d'angle de contact le laissent supposer puisqu'ils montrent que la surface des filaments contenant la protéine est plus hydrophile que les filaments qui n'en contiennent pas. Nous pourrions suggérer que l'agrégation est induite par le caractère hydrophobe du PLGA mais des agrégats de BSA dans des filaments de PVA qui est un polymère plus hydrophile ont aussi pu être observés [157]. Dans ce cas, l'ajustement du pH de la solution s'est révélé être une excellente stratégie pour limiter l'apparition de ces agrégats [12]. Des tensio-actifs sont aussi parfois ajoutés dans les solutions protéger les protéines [13]. Il serait intéressant de vérifier leur influence sur la distribution des protéines dans les matériaux.

On observe une disparition progressive des nodules de la surface des filaments avec l'augmentation de concentration de PEG (Figure 4-7). On pourrait alors supposer que la présence de PEG permette à la BSA de mieux se disperser dans les filaments. Une cristallisation surfacique d'une partie de la matière semble apparaître pour l'échantillon comportant 30% de PEG. La différence est notable entre l'échantillon ne contenant que 10 % de PEG, pour lequel il n'est pas observé de facettage de la surface des filaments, et celui en contenant 30%. Une étude antérieure a démontré que la répartition de PEO dans un mélange électrofilé polystyrène (PS) et PEO dépendait du rapport volumique entre les deux polymères [159]. Ce phénomène est observé dans le cas de filaments et non dans le cas de films, préparés par coulage. Les auteurs expliquent cela par le fait que dans les filaments préparés par électrofilage, la taille des domaines de PEO est plus petite (à l'échelle submicronique) que dans le cas de la réalisation de films épais. Ainsi, les filaments contenant au moins 30% de PEO (dans le PS) se comportent comme les films d'un point de vue répartition PEO-PS et cristallisation du PEO. En revanche, une teneur en PEO inférieure ou égale à 20% induit une cristallisation homogène du PEO, avec des domaines restant isolés à l'échelle submicronique. Ces résultats semblent conforter l'idée que le facettage des filaments contenant 30% de PEG soit lié à une cristallisation de domaines continus de PEG au sein du filament. Il est aussi possible que les domaines plus volumineux du PEG enrobe la protéine ce qui permet de limiter son agrégation. Néanmoins, aucune étude n'a été trouvée dans la littérature faisant référence à ce phénomène.

Dans le cas des filaments obtenus à partir de l'aiguille coaxiale, la morphologie des filaments avec et sans BSA est très similaire. Cela montre donc que la BSA est mélangée de manière homogène dans les
filaments ou que la BSA est bien isolée au cœur du filament et n'a donc pas d'influence sur la morphologie de surface. De manière générale, les filaments semblent, à certains endroits, dédoublés comme si deux filaments s'étaient formés côte à côte au lieu de se former de manière concentrique. La caractérisation de la structure des filaments cœur-coquille est souvent réalisée en microscopie électronique à transmission (MET). Dans le cas de cette étude, l'observation en MET n'a pas montré de différence de contraste au sein du filament. Les densités du PEG et du PLGA sont sûrement trop proches pour obtenir une différence de contraste en MET. Afin de caractériser la structure des filaments, de la microscopie confocale de fluorescence a été utilisée. De la BSA couplée à un fluorophore a été introduite dans la solution aqueuse de PEG dans les mêmes conditions que les autres filaments (Figure 4-7 et Annexe 13). Dans ce cas aussi, il semblerait que la BSA forme des agrégats car il est possible d'observer des îlots fluorescents au sein du filament. Cela montre alors que la présence de PEG ne permet pas d'éviter l'agrégation de la protéine. Bien que non visible en surface, les filaments composés d'un mélange de 30% de PEG doivent aussi sûrement comporter des agrégats de BSA. Concernant les filaments élaborés à partir des aiguilles coaxiales, il semblerait que les filaments adoptent de manière générale une structure cœur-coquille. Néanmoins, la BSA fluorescente ne semble parfois pas rester au cœur du filament et semble présente dans tout le volume du filament (cela est visible sur l'image de droite qui correspond à une coupe au centre du filament, Annexe 13). La structure des filaments obtenus ne semble donc pas toujours uniforme.

> Analyse DC après dissolution des filaments

Les filaments ont été dissous dans l'HFIP après séchage. La concentration en BSA dans les solutions électrofilées a été adaptée afin qu'une fois les filaments dissous, la quantité de PLGA soit de 0,1% et la concentration de BSA soit d'environ 0,05 mg/mL pour chaque condition (Tableau 4-4). Pour rappel, la concentration en BSA a été fixée afin d'obtenir un signal convenable provenant de la protéine et la concentration en PLGA a été fixée car le polymère présente un signal de DC important qui peut perturber l'interprétation des résultats. Une comparaison relative entre les spectres des différentes conditions d'électrofilage est ainsi possible. La concentration en PEG n'a pas besoin d'être fixée car le polymère ne présente pas de signal DC dans le domaine de longueur d'onde d'intérêt.

Type d'échantillon	Conc. BSA (mg/mL)	Conc. PLGA (%)	Conc. PEG (%)	ΔConc. PLGA (%)
Fil-PLGA		0,100 ±0,001		0.002
Fil-PLGA + BSA	0,067 ±0,001	0,098 ±0,001		0,002
Fil-PLGA-PEG10%		0,100 ±0,001	0,012 ±0,001	0.002
Fil-PLGA-PEG10% + BSA	0,067 ±0,001	0,098 ±0,001	0,011 ±0,001	0,002
Fil-PLGA-PEG30%		0,100 ±0,001	0,043 ±0,001	0.001
Fil-PLGA-PEG30% + BSA	0,067 ±0,001	0,099 ±0,001	0,042 ±0,001	0,001
Fil-COAX-PLGA-PEG		0,100 ±0,001	0,019 ±0,001	0.001
Fil-COAX-PLGA-PEG + BSA	0,028 ±0,001	0,101 ±0,001	0,019 ±0,001	0,001

Tableau 4-4 Concentration théorique des solutions d'HFIP calculée après dissolution de chaque échantillon préparé avec ou sans BSA. Ces concentrations ont été déterminées à partir des masses pesées pour la préparation des solutions et des filaments considérés secs (sans HFIP).

Les spectres traités (*i.e.* spectre de référence soustrait) obtenus après dissolution des filaments sont présentés en Figure 4-8-(a). Les spectres sont comparés au spectre de la BSA dans une solution d'HFIP contenant du PLGA à 0,1% et n'ayant pas été soumise à l'étape d'électrofilage. Les spectres traités présentent des tendances très différentes en fonction des conditions d'électrofilage. L'échantillon

électrofilé avec de la BSA et du PLGA (Fil-PLGA + BSA) présente ainsi des intensités (négatives) de pics à 208 et 222 nm qui sont plus faibles que celles mesurées pour l'échantillon non électrofilé. La différence de rapport de signal à 208 et 222 nm est de 23%. Les pics à 191 nm ne peuvent pas être comparés car le signal du spectre de la BSA électrofilé avec du PLGA est trop bruité. L'introduction de 10% de PEG (Fil-PLGA-PEG10% + BSA) permet d'augmenter l'intensité des pics situés à 208 et 222 nm pour se rapprocher du spectre de la solution non électrofilée. Une augmentation de la concentration en PEG à 30% augmente davantage l'intensité du pic situé à 208 nm, au-delà même de celle mesurée pour le spectre de la solution non électrofilée. Cela s'accompagne également d'une disparition apparente du pic à 222 nm. Une très forte diminution de l'intensité de ce même pic est observée pour l'échantillon préparé en coaxial, bien que les intensités considérées soient quelque peu différentes. Il est ici important de rappeler que même si les concentrations en BSA devraient théoriquement être identiques dans chaque solution, cela n'a pas pu être vérifié car le dosage de la protéine n'est pas possible dans le solvant HFIP. Pour les deux derniers échantillons considérés, *i.e.* celui avec 30% de PEG et celui électrofilé en coaxial, l'intensité du pic à 191 nm est à peu près deux à trois fois plus faible que pour le spectre de la BSA dans HFIP. Cela pourrait démontrer une diminution du nombre d'hélices  $\alpha$  originelles pour former des feuillets  $\beta$  (pic négatif vers 220 nm), en prenant comme référence la Figure 4-2. Néanmoins, le pic devrait être moins intense que les pics correspondant à une structure en hélice  $\alpha$ , ce qui n'est pas le cas de l'échantillon contenant 30% de PEG. Il est aussi possible de remarquer que, pour ce même spectre ainsi que pour celui de l'échantillon fait en coaxiales, les spectres références présentent des intensités plus élevées à 210 nm que pour les deux premières conditions (Figure 4-8-(d)). Cette différence pourrait également avoir une influence sur l'allure des spectres.

Malgré les efforts effectués pour maintenir les paramètres constants pour chaque condition, il est difficile de pouvoir comparer les spectres de BSA obtenus. Les spectres sont très différents et ne ressemblent pas forcement à un spectre classique de protéine. Le PLGA qui présente un signal de DC important pourrait être la cause de ces différences. Même si la concentration du polymère a été maintenue constante le plus possible, quelques différences de concentrations peuvent être présentes entre les conditions et entre les solutions références et les solutions contenant la protéine. Ces différences, indiquées dans le Tableau 4-4, varient de 0,002% à 0,001% entre les références et solutions contenant la BSA. Même si ces différences sont très faibles, elles peuvent suffire à modifier légèrement le spectre traité car, comme vu précédemment, le PLGA présente déjà un signal de DC à partir de 0,001%. Il est donc difficile de tirer des conclusions sur l'influence du procédé d'électrofilage et sur l'influence positive ou négative de l'ajout de PEG dans la solution à électrofiler sur la conformation de la BSA, que ce soit en mélange ou en coaxiales.

> Analyse DC après incubation des filaments dans l'eau

Une autre stratégie a été testée afin d'étudier l'influence de l'électrofilage sur la protéine : les filaments ont été incubés à 37°C sous agitation légère dans l'eau pendant plusieurs jours afin que la BSA soit libérée. A la suite de l'incubation, la protéine présente dans le milieu aqueux a été dosée puis analysée en DC.

Une première analyse a été effectuée après 3 jours d'incubation des quatre types de filaments de cette étude. Les concentrations de protéine mesurées par NanoDrop<sup>™</sup> sont indiquées dans le Tableau 4-5. Les valeurs varient de 0,04 mg/mL pour les filaments de PLGA jusqu'à 0,07 mg/mL pour les filaments de PLGA et PEG30% et les filaments faits à partir d'une aiguille coaxiale. Ces concentrations sont proches de la concentration en BSA utilisée pour les essais précédents qui était de 0,05 mg/mL.



Figure 4-8 Etude de l'influence du procédé d'électrofilage sur la structure secondaire de la BSA. (a) Spectres DC de la BSA après avoir été introduite en solution en présence de polymère, électrofilé puis dissout dans l'HFIP. Différentes conditions d'électrofilage ont été testées : filament de PLGA, PLGA et PEG10%, PLGA et PEG 30%, filament fait par un système coaxial PLGA/PEG. (b) Rapport de signal de DC à 208 et 222 nm et (c) rapport de signal DC à 191 et 208 nm pour les différentes conditions testées (les \* indiquent les valeurs de rapport pour lesquels un écart-type n'a pas pu être défini). (d) Spectres bruts de la BSA (spectre bleu) et de la solution référence (spectre orange) pour les différentes conditions testées.

Tableau 4-5 Concentration en BSA dans l'eau déterminée par NanoDrop<sup>™</sup> après 3 jours d'incubation à 37°C des différents types de filaments testés.

Type d'échantillon	Fil-PLGA	Fil-PLGA-PEG10%	Fil-PLGA-PEG30%	Fil-COAX-PLGA-PEG
Concentration BSA (mg/mL)	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,01

L'analyse DC a d'abord été réalisée sur les échantillons de filaments de PLGA et les filaments de PLGA + PEG30%. Ces deux échantillons ont tous deux montrés très peu signal DC. Les spectres bruts des échantillons de filaments de PLGA-PEG30% avec et sans BSA sont présentés comme exemple en Figure 4-9. Un faible signal est perçu à environ 190 nm mais le spectre référence suit la même tendance, ce qui indique que ce signal ne provient pas de la protéine. Dans ce cas, la protéine n'est visiblement pas suffisamment concentrée pour être détectée en DC. Cela est surprenant car les concentrations détectées au NanoDrop<sup>™</sup> sont proches voire supérieures aux concentrations utilisées pour les analyses précédentes qui étaient de 0,05 mg/mL.



Figure 4-9 Spectres de DC bruts des milieux aqueux dans lesquels ont été incubés les filaments de PLGA + PEG30% avec (spectre bleu) et sans (spectre orange) BSA.

Une seconde analyse a été réalisée sur des filaments de PLGA contenant de la BSA selon une teneur dix fois plus importante que pour les essais précédents. Les filaments ont ensuite été incubés dans de l'eau à 37°C pendant 6 jours. La concentration de BSA indiquée par le NanoDrop<sup>™</sup> est de 0,08 mg/mL. La solution a dû être diluée 1,6 fois car le signal de DC de la BSA était trop intense. Les résultats de DC obtenus sont présentés en Figure 4-10.

Il est, cette fois, possible de reconnaître le spectre de la BSA (Figure 4-10-(a)). Un signal très faible est, une fois de plus, observé sur le spectre référence à environ 190 nm. La référence correspond au milieu aqueux dans lequel a été incubée la membrane de PLGA sans BSA. Le signal peut alors provenir d'impuretés introduites lors du filage ou de la manipulation des filaments. Il est aussi possible que la membrane ait libéré des espèces en très faible concentration dans le milieu pendant l'incubation. La dégradation du PLGA par hydrolyse s'effectue sur plusieurs mois mais elle pourrait avoir légèrement commencé au bout de quelques jours.



Figure 4-10 Résultats de DC obtenus sur le milieu aqueux dans lequel une membrane de PLGA contenant de la BSA concentrée a été incubée 6 jours. (a) Spectres bruts de DC avec (spectre bleu) et sans (spectre orange) BSA. (b) Spectres de la BSA libérée des filaments de PLGA+BSA dans l'eau (BSA-EAU-PLGA) et de la BSA dans l'eau (BSA-EAU). (c) Rapport des signaux à 191 et 208 ou 208 et 222 nm pour les différents spectres (les \* indiquent les valeurs de rapport pour lesquels un écart-type n'a pas pu être défini).

Le spectre de la BSA obtenu est comparé au spectre de la BSA dans l'eau sans avoir subi le procédé d'électrofilage (Figure 4-10-(b)). Hormis une légère différence d'intensité, les deux spectres sont très similaires. La tendance est confirmée par des rapports d'intensité de pic très proche : le rapport à 191 et 208 est différent de 6% et le rapport à 208 et 222 nm est différent de 3% (Figure 4-10-(c)). Ces résultats montrent donc que la BSA, même après avoir été électrofilée, est libérée des filaments avec une structure très proche de sa structure native. L'impact de l'étape de mise en forme semble donc très faible vis-à-vis de la protéine. Néanmoins, ces résultats ne nous indiquent pas si la structure de la BSA a subi des modifications (en plus de celles induites par le solvant HFIP) pendant la mise en forme des filaments. Ces résultats sont donc très encourageants pour la suite de l'étude. Il serait intéressant de vérifier si la BSA est aussi libérée dans une structure proche de sa structure native pour les autres conditions d'électrofilage comme les mélanges PLGA-PEG et l'électrofilage coaxial.

Il est aussi important de noter que les résultats obtenus sur les concentrations mesurées par NanoDrop<sup>™</sup> et les résultats obtenus en DC ne sont pas tous cohérents. Effectivement, pour une concentration de 0,07 mg/mL de BSA, aucun signal de DC n'a été obtenu indiquant que très peu de protéines ne sont présentes en solution. Alors que pour une autre concentration proche en BSA à 0,08 mg/mL, un signal important de DC a pu être détecté indiquant la présence de protéines en solution. Les résultats obtenus en DC sont, cependant, cohérents avec la quantité de BSA introduite initialement

dans les solutions utilisées pour l'électrofilage puisqu'une teneur 10 fois plus importante a été utilisée dans le deuxième cas. Ces résultats remettent donc en question la fiabilité des valeurs de concentrations obtenues par NanoDrop<sup>™</sup> (absorbance). Les concentrations utilisées étant très faibles, l'appareil est peut-être en limite de sensibilité. Il serait donc intéressant de renouveler les mesures à partir d'une autre technique de dosage de protéine comme le test BCA (BiCinchoninic acid Assay)<sup>6</sup>.

#### 3.4 Cinétique de libération de la BSA à partir des filaments

Un suivi de la cinétique de libération de la BSA a pu être réalisé en parallèle des analyses de DC. La cinétique a été déterminée à partir des valeurs de concentrations mesurées par NanoDrop<sup>™</sup>. Etant donné le questionnement actuel sur la fiabilité de certains résultats obtenus précédemment avec le NanoDrop<sup>™</sup>, il serait important de renouveler les mesures à partir d'une autre technique de dosage de protéine.

La courbe a été tracée pour les différents types de filaments produits. Les filaments ont été plongés dans l'eau et le milieu a été prélevé à 3, 7, 10 et 15 jours d'incubation. En prévention d'un phénomène de saturation du milieu en protéines, le milieu a été complétement renouvelé à 3 et 7 jours. A 10 et 15 jours, seulement un faible volume a été prélevé. Comme expliqué dans la partie précédente, un dosage de la BSA après 6 jours d'incubation a aussi été effectué sur une membrane de PLGA contenant de la BSA selon une teneur 10 fois plus concentrée.



Figure 4-11 Graphique du pourcentage de BSA libérée dans l'eau des différents types de filaments (\* indique le pourcentage de BSA libérée dont l'incertitude n'a pas pu être déterminée).

Le graphique présentant la cinétique de libération de la BSA à partir des différents types filaments est présenté en Figure 4-11. Les incertitudes ont été calculées à partir de l'incertitude obtenue sur les mesures d'absorbance. Pour les cinq conditions testées, le pourcentage de BSA libérée est important après 3 jours d'incubation puis se stabilise jusqu'à 15 jours. La tendance est différente pour l'échantillon « Fil-COAX-PLGA-PEG » car le pourcentage de BSA libérée augmente à nouveau à partir de 10 jours. Les pourcentages libérés de BSA jusqu'à 15 jours sont, de manière générale, assez faibles : 6% pour la membrane de PLGA et 18% pour les filaments produits par des aiguilles coaxiales. Il est intéressant de noter que les échantillons « Fil-PLGA-PEG30% » et « Fil-COAX-PLGA-PEG » présentent des pourcentages de BSA libérée presque deux fois plus importants que les échantillons « Fil-PLGA »

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Le test BCA permet de doser la quantité de protéine en milieu liquide par colorimétrie. En milieu alcalin, les protéines sont capables de réduire Cu(II) en Cu(I). Avec l'acide bicinchoninique, le Cu(I) forme un complexe coloré qui peut être dosé par mesure d'absorbance à 562 nm.

et « Fil-PLGA-PEG10% ». Il semblerait donc que la proportion en PEG dans les filaments puisse moduler le pourcentage de protéine libéré. A 10% de PEG dans les filaments, 7% de BSA est libérée après 15 jours alors qu'à 30% de PEG, presque le double de BSA est libéré, 12%. La structure des filaments obtenue à partir d'aiguilles coaxiales semble pouvoir aussi augmenter la teneur en BSA libérée : 17% sont libérés après 15 jours. Il est aussi intéressant de remarquer que pour ces mêmes filaments, la cinétique de libération soit fractionnée en deux temps. Une augmentation brutale du pourcentage de BSA libérée est visible à 3 jours mais aussi à 15 jours. Ce phénomène est peut-être lié à la structure des filaments et à leur hétérogénéité qui avaient été remarquées précédemment (page 121). On pourrait imaginer par exemple que les filaments de PEO avec la BSA qui ne sont pas enrobés dans la matrice de PLGA soient libérés rapidement sur les trois premiers jours alors que ceux qui sont enrobés dans le PLGA soient libérés plus tardivement.

La membrane de PLGA contenant 10 fois plus de protéines (Fil-PLGAx10) présente un pourcentage légèrement plus élevée de protéine libérée à 6 jours que la membrane de PLGA à 7 jours : 7% au lieu de 5,5%, respectivement. Il semblerait que la teneur en BSA au sein des filaments de PLGA n'ait pas beaucoup d'influence sur la quantité libéré après 6 ou 7 jours.

Ces résultats sont donc intéressants puisqu'il semblerait que la présence de PEG et la structure cœurcoquille PEG-PLGA permettent de moduler la quantité de protéine libéré dans le milieu. Une teneur en PEG plus importante de 10 à 30% permet de libérer une quantité plus importante de BSA. Cela a déjà été remarqué dans une étude de 2018 [160] : au-delà de 10% de PEG, une petite molécule (acyclovir) avait été libérée en plus grande quantité à partir de filaments de PLGA. Les filaments à la structure cœur-coquille ont libéré une quantité aussi importante que les filaments contenant 30% de PEG. Une étude de 2010 avait aussi comparé la cinétique de libération de la BSA à partir de filaments électrofilés composés d'un mélange de PCL et environ 20% de PEG ou à partir de filaments cœur-coquille (cœur de PEG avec BSA et coquille de PCL) [149]. Un taux de libération important entre 15 et 20% avait aussi été obtenu sur les premiers temps et plus exactement sur les 4 premières heures d'incubation. Ce phénomène est appelé effet « burst » dans la littérature et désigne le fait de libérer une grande quantité de biomolécules très rapidement indépendamment de la dégradation du polymère. Il est assez commun de le retrouver sur les premières heures après incubation de filaments électrofilés ou tout autre type de matériau développé pour la délivrance de biomolécules. Le mécanisme de cet effet est toujours assez peu compris mais est souvent relié au fait qu'une partie importante des biomolécules est localisée à la surface du matériau [161].

Les pourcentages de BSA libérés après 15 jours d'incubation obtenus dans l'étude de 2010 [149] sont plus importants que ceux obtenus dans cette étude puisqu'ils atteignent entre 50 et 60%. Cependant, une autre étude avait montré que la libération de lysozyme (protéine globulaire) à partir de filaments cœur-coquille (cœur : PVA + lysozyme ; coquille : PLGA) atteignant à peine 10% après 10 jours d'incubation [162]. Le taux de libération de la protéine est donc sûrement dépendant du polymère et son interaction avec la protéine. Dans notre cas, il est possible qu'une partie assez importante de la BSA reste adsorbée sur le PLGA. En se référant toujours à l'étude de 2010 [149], il est aussi possible de remarquer que la libération de la BSA à partir de filaments contenant 20% de PEG est plus importante qu'à partir de filaments cœur-coquille avec une différence de 10%. Cela est surprenant car cet effet n'a pas été observé pour cette étude: une quantité similaire de BSA a été libéré des filaments cœurcoquille et des filaments contenant 30% de PEG. Cela montrerait peut-être qu'une partie de PEG des filaments cœur-coquille se trouve en surface et se dissout donc assez rapidement.

Il est important de rappeler que ces résultats restent toutefois à être vérifiés avec une technique de dosage de protéine plus sensible que le NanoDrop<sup>™</sup>.

### 4. Conclusion

Une quantité assez importante d'information a pu être récoltée à partir des analyses par DC sur la BSA. Les résultats ont permis de conclure sur l'influence du solvant et des polymères en solution sur la BSA et d'étudier la structure de la protéine après avoir subi le procédé d'électrofilage.

Concernant les essais sans électrofilage, les résultats de DC obtenus sur les solutions d'HFIP avec la BSA ont d'abord montré que le solvant pouvait induire une légère modification de la structure de la protéine. Dans la littérature, il est déjà connu que les solvants organiques peuvent perturber la structure secondaire des protéines et donc leur activité [163]. Dans notre cas, nous avons donc confirmé cette tendance avec le solvant HFIP, tout en montrant une certaine réversibilité lorsque la protéine se retrouve dans un milieu aqueux. Les résultats obtenus sur la BSA en présence de PEG ont aussi pu confirmer que jusqu'à 10% de concentration, le PEG ne semble pas induire de modifications de structure de la protéine. Ces résultats confirment les mécanismes de stabilisation du PEG sur les protéines proposés dans la littérature : même à concentration élevée en PEG, celui-ci n'interagit pas avec la protéine. Aussi, la structure secondaire de la BSA ne semble pas avoir été modifiée par la présence de PLGA jusqu'à 0,1%.

La structure de la BSA a aussi été étudiée après électrofilage. La BSA a été introduite dans des filaments de PLGA, de PLGA avec 10% de PEG ou 30% de PEG et des filaments cœur-coquille PEG-PLGA. Les observations MEB des différents filaments obtenus ont permis de remarquer la présence d'agrégats dans les filaments de PLGA qui correspondent sûrement à de la BSA précipitée. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par l'observation MEB de ces filaments après avoir été incubés dans l'eau. S'il s'agit de la BSA qui est soluble dans l'eau, ces nodules devraient disparaître. Ces agrégats sont beaucoup moins visibles lorsque les filaments contiennent 30% de PEG. Il est néanmoins difficile de conclure que le PEG permette d'homogénéiser la distribution de la BSA dans les filaments car des agrégats de BSA fluorescentes ont aussi été remarqués au sein des filaments cœur-coquille. Le PEG pourrait cependant éviter la localisation préférentielle de la BSA à la surface des filaments. Les analyses des filaments par TOF-SIMS devraient prochainement nous donner cette information.

L'étude réalisée sur les différents types de filaments dissous dans l'HFIP a montré des différences dans les spectres de la BSA. Cependant, les différences obtenues entre les spectres n'ont pas été attribuées à une différence structurale car le PLGA présente un signal de DC trop important sur la même gamme de fréquence. Des informations ont néanmoins pu être obtenues sur les analyses DC de la BSA libérée des filaments. Le spectre de la BSA libérée à partir de filaments de PLGA a effectivement montré que sa structure était proche de sa structure native. Ainsi, deux hypothèses peuvent être émises : soit la structure de la BSA n'a pas été modifiée par le PLGA, soit la structure a été modifiée mais a retrouvé sa conformation originelle lors de son retour dans l'eau. Au vu des informations présentes dans la littérature sur la modification de structure des protéines que peut causer un polymère hydrophobe comme le PLGA [146], la deuxième hypothèse semble plus probable. La capacité de la BSA à retrouver sa structure native a été observée lorsque celle-ci a été réintroduite dans l'eau après avoir été mis en contact avec de l'HFIP. La BSA semble être une protéine assez flexible capable de facilement retrouver sa structure native. Cela a aussi été confirmé par un test mis en place pour tenter de dénaturer et détruire la structure de le BSA par augmentation de la température. Une solution de BSA a été chauffée à 90°C puis a été analysée en DC environ 1 heure après. Le spectre correspondait toujours à la structure native de la BSA. L'influence de la température (dès 65°C) sur la dénaturation de la BSA a pourtant été

confirmée dans la littérature [164]. Même après un chauffage important où la structure de la BSA a été modifiée, il semble donc qu'elle ait été capable de retrouver sa structure secondaire après refroidissement.

Le spectre DC de la BSA libérée à partir de filaments contenant 10 fois plus de BSA a pu être obtenu mais ce n'est pas le cas pour les autres conditions. A la suite de ces résultats, il serait intéressant de renouveler les analyses DC sur la BSA libérée à partir de filaments Fil-PLGA-PEG10%, Fil-PLGA-PEG30% et Fil-COAX-PLGA-PEG avec une teneur en BSA, de même, dix fois plus importante. Vis-à-vis du PLGA, le PEG a un rôle stabilisant déjà connu. Une BSA proche de sa structure native ayant été libérée à partir de filaments de PLGA, nous pourrions donc nous attendre à obtenir les mêmes résultats à partir des filaments contenant du PEG. Pour comparer les différentes conditions entre elles et connaître quelle condition permet de conserver au mieux la structure d'une protéine, il faudrait peut-être utiliser une protéine plus sensible, ou moins flexible que la BSA.

Le NanoDrop<sup>™</sup> utilisé pour déterminer la concentration de la protéine en milieu aqueux lors du suivi de la cinétique n'est sûrement pas adapté pour la gamme de concentrations utilisée au cours de l'étude. Cela expliquerait les incohérences obtenues entre certains résultats en DC et les concentrations déterminées. Une tendance a tout de même été dégagée lors du suivi de la cinétique de libération de la BSA. **Cette tendance est sûrement proche de la réalité car elle est similaire à ce qui a été obtenu dans la littérature sur le taux de protéine libérée ou sur l'effet « burst »** [149][156]. Il serait intéressant de renouveler ces tests avec des teneurs en BSA plus importantes ou une technique permettant de déterminer la concentration en BSA de manière plus résolue, comme les tests BCA ou test ELISA (tests expliqué en première partie du Chapitre 5, 1.2.7, page 143).

La structure de la BSA s'est montrée assez flexible en fonction de son environnement mais ce n'est pas le cas de toutes les protéines. Le facteur de croissance HGF (hepatocyte growth factor) utilisé dans la première partie du Chapitre 5 semble, par exemple, être très sensible au vu des recommandations fournisseur qui déconseillent même une agitation sous vortex. A partir des informations tirées des analyses en DC et des informations présentes dans la littérature, le solvant organique et les polymères hydrophobes comme le PLGA semblent pouvoir induire des modifications dans la structure de protéines. Néanmoins, les polymères résorbables comme le PLGA peuvent difficilement être remplacés car ils sont très intéressants pour l'ingénierie tissulaire : ils sont capables de maintenir leurs propriétés mécaniques pendant plusieurs semaines et se dégrader sur plusieurs mois, ce qui correspond au temps nécessaire pour régénérer un tissu biologique. Les polymères plus hydrophiles comme le PEG sont souvent solubles dans les milieux biologiques, ce qui ne permet pas le maintien de leurs propriétés mécaniques. A ce jour, le système d'aiguille coaxial qui permet de produire des filaments à la structure cœur-coquille semble être la stratégie la plus adaptée pour protéger les protéines et produire des filaments résorbables qui se dégradent sur plusieurs mois. En plaçant la protéine dans la solution aqueuse au cœur du filament, ce système permet d'isoler la protéine à la fois du solvant organique du polymère résorbable. De plus, les résultats de cinétique de libération de la BSA (qui doivent être renouvelés) semblent montrer que les filaments cœur-coquille ont aussi l'avantage de libérer une plus grande quantité de protéine au cours du temps. Cela a aussi été remarqué dans la littérature [149]. Pour ces raisons, l'agent de croissance utilisé dans le cadre de l'élaboration de structures pour la régénération parodontale (chapitre 5 partie 2) sera encapsulé au cœur de filaments produits à partir d'une aiguille coaxiale. Concernant les structures produites pour la régénération hépatique (Chapitre 5 partie 1), cette stratégie n'a pas été mise en place car l'étude pas DC a été effectuée après.

## Chapitre 5 Etudes biologiques de structures électrofilées pour la régénération tissulaire

# 1. Etude biologique de structures électrofilées pour la régénération hépatique

#### 1.1 Contexte et objectifs

Le foie est un des rares organes humains à posséder l'incroyable capacité de s'auto-régénérer. Il est un organe vital qui assure plusieurs fonctions, notamment un rôle de « filtre » permettant d'éliminer toutes les toxines accumulées dans le sang. Il s'agit d'un organe alors souvent malmené par différents facteurs qui peuvent induire sa dégradation. Malheureusement, si la dégradation du foie est plus rapide que sa régénération (en cas d'intoxication, de maladies virales ou cancéreuses), de sérieuses complications peuvent arriver avec interventions cliniques et pouvant même mener jusqu'à la mort. C'est pourquoi l'ingénierie tissulaire est aussi étudiée dans le cadre de la régénération de tissu hépatique.

Une partie de cette thèse a été dédiée à l'étude de structures organisées résorbables produites par électro-impression pour la fabrication artificielle de tissu hépatique. La régénération hépatique est très souvent étudiée dans un environnement bidimensionnel, ce qui fait souvent défaut car les cellules ne s'organisent pas de manière efficace pour produire un tissu fonctionnel dans cette configuration. C'est pourquoi, il est intéressant d'utiliser la technique d'électro-impression pour guider la croissance et l'organisation des cellules hépatiques dans l'espace. Ce projet a été monté en collaboration avec le professeur Yasuyuki Sakaï (Sakaï Lab) et Eric Leclerc de l'unité mixte internationale LIMMS (Laboratory for integraded micro-mechatronic systems), avec l'aide du Dr. Yannick Tauran du LMI, en détachement au LIMMS durant la période du projet. Les travaux du Pr. Y.Sakaï et du Dr. E. Leclerc se concentrent en partie sur l'étude de la régénération hépatique à partir de cellules pluripotentes induites (iPS). Les cellules iPS sont des cellules souches capables de se différencier en différents types cellulaires. La particularité de ces cellules est leur origine car contrairement aux cellules souches mésenchymateuses qui sont naturellement présentes dans le corps, les cellules iPS sont produites artificiellement à partir de cellules adultes différenciées. Le caractère pluripotent de ces cellules est induit grâce à une modification génétique qui a fait l'objet du prix Nobel de médecine de 2012, attribué à John B. Gurdon et Shinya Yamanaka. Ces cellules possèdent un fort potentiel car elles représentent une alternative aux cellules souches mésenchymateuses qui sont présentes en faible quantité dans le corps. Le protocole de différentiation des cellules iPS en hépatocytes est un processus toujours étudié [165][166]. Il a lieu en quatre phases différentes régulées par un cocktail de cytokines et de facteurs de croissances. Parmi les facteurs de croissances, l'HGF (hepatocyte growth factor) est utilisé dans la phase de maturation des hépatocytes du stade II au III. L'HGF qui a un rôle essentiel dans la différentiation hépatique, sera donc utilisé et intégré dans les structures organisées. L'objectif est d'étudier l'influence d'un environnement 3D, avec un possible gradient de concentration d'HGF à l'intérieur, sur la maturation des hépatocytes.

Les cellules iPS coûtent beaucoup de ressources financières et de temps pour être cultivées et différenciées. Afin d'optimiser et tester le système (structure 3D et HGF) dans de bonnes conditions, une pré-étude a été mise en place avec un modèle cellulaire différent. Les cellules de la lignée HepG2 ont été choisies. Il s'agit de cellules hépatiques cancéreuses régulièrement utilisées pour tester le métabolisme de médicament ou dans des études de cytotoxicité. Ces cellules possèdent un récepteur transmembranaire spécifique de l'HGF : le c-MET [167], [168]. Elles sont donc capables de répondre à une interaction avec l'HGF par une activité cellulaire. Dans la littérature, il a été montré que la présence

d'HGF avait tendance à bloquer la prolifération des cellules HepG2 [167], [169]. Afin de vérifier l'interaction de l'HGF introduit dans les filaments avec les cellules HepG2, la prolifération et l'activation du récepteur c-MET ont été étudiées. S'agissant de la première étude biologique de cette thèse, une partie du travail a aussi été consacrée à l'optimisation des conditions de préparation des échantillons pour la culture cellulaire. Cette optimisation comprend un protocole de séchage, pour éliminer toute trace résiduelle de solvant, et de stérilisation des filaments.

Chronologiquement, il est important de noter que ce travail a été réalisé avant l'étude permettant de protéger les protéines en électrofilage (Chapitre 4) et avant l'optimisation des conditions de dépôt localisé (Chapitre 3). L'ensemble de ces tests a donc été réalisé sur des membranes de filaments sous forme de mats produits par électrofilage conventionnel. Le copolymère PLGA 85 qui possède un taux de dégradation de plusieurs mois a été utilisé pour cette étude. Pour produire les filaments, l'HGF a été directement introduit dans les solutions de PLGA.

#### 1.2 Matériels et méthodes

Tous les échantillons de filaments de PLGA ont été produits et séchés au LMI (Lyon) alors que l'ensemble des cultures cellulaires et des tests biologiques a été réalisé au LIMMS (Tokyo). En ce qui concerne la stérilisation, celle-ci a été réalisée en France pour la partie 2.3, et au Japon pour la partie 2.4.

#### 1.2.1 Composés et matériels

L'acide poly(lactique-co glycolique) (PLGA) à 85% en lactique et 2,3 dl/g de viscosité inhérente a été acheté chez CORBION. Le solvant organique 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) utilisé pour dissoudre le PLGA a été acheté chez TCI. La protéine recombinante humaine HGF (*hepathocyte growth factor*) a été achetée chez PEPROTECH et a été produite par des cellules d'insectes. La protéine a été livrée sous forme lyophilisée et a dû être reconditionnée en aliquots en présence de BSA à 0,1% (BSA : albumine de sérum bovin, Sigma Aldrich) dans du PBS 1X (PBS : phosphate buffered saline, Fisher Scientific).

Pour la stérilisation des filaments, l'éthanol absolu de chez CARLO ERBA, de l'eau stérile, du PBS 1X et la solution d'antibiotique et antifongique (Suspension de Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B) de chez WAKO ont été utilisés.

Pour la culture cellulaire, des lamelles stériles en plastique Thermanox<sup>™</sup> de 13 mm de diamètre ont été achetées chez Dominique Dutscher, et des plaques de 24 puits de culture cellulaire (IWAKI) ont été utilisées. Lorsque des membranes multicouches de filaments ont été testées en culture cellulaire, des joints en PTFE (France joint) de 15 mm de diamètre ont été stérilisés et introduits dans les puits afin de maintenir la membrane au fond du puits.

#### 1.2.2 Essais d'électrofilage et solutions

Des solutions de PLGA à 0,09 g/mL d'HFIP ont été préparées pour chaque essai d'électrofilage. Cette concentration a été choisie car les résultats obtenus dans le Chapitre 2 ont montré qu'elle permettait d'obtenir des filaments fins et uniformes. La protéine HGF a ensuite été ajoutée aux solutions homogènes de polymères. Cela a pour conséquence l'apparition d'un halo blanchâtre dans la solution qui disparait après quelques minutes avec l'agitation pour donner des solutions transparentes et homogènes.

Filament	Concentration PLGA (g/mL)	Concentration HGF (µg/mL)	Teneur en HGF dans les filaments (µg/g)
PLGA	0,09	0	0
PLGA + HGF1X	0,09	0,05	0,56
PLGA + HGF10X	0,09	0,50	5,56

Tableau 5-1 Concentration des solutions de polymère avec ou sans HGF, utilisées pour l'ensemble des essais d'électrofilage.

Différentes conditions d'électrofilage ont été utilisées pour produire les échantillons. Dans un premier temps, les filaments ont été directement déposés sur les lamelles destinées à la culture cellulaire. Cela a permis de produire les échantillons rapidement et d'éviter de manipuler les filaments pour ne pas induire de contaminations lors des cultures cellulaires. Cependant, les dépôts sur lamelle correspondent à des dépôts très fins de quelques filaments d'épaisseur. Il est difficile de déposer des épaisseurs plus importantes car ces lamelles (en plastique) sont isolantes et ont donc tendance à repousser les filaments durant l'étape d'électrofilage. Une fois réalisées, ces structures permettront aux cellules de rentrer en contact à la fois avec les filaments et avec la lamelle de culture qui les supportent. Afin de vérifier l'influence des filaments sur les cellules de manière plus marquée, des membranes plus épaisses ont été déposées sur feuille d'aluminium dans un second temps. Ces membranes plus épaisses permettront de recouvrir totalement la lamelle de culture et donc de conclure de manière fiable sur l'influence des filaments sur les cellules. Même si ces termes ne correspondent pas tout à fait à la réalité, les membranes formées sur lamelle ont été nommées « membrane monocouche » et les membranes formées sur aluminium ont été nommées « membrane mulitcouche ».

Membrane monocouche : dépôt sur lamelle

Le montage d'électrofilage utilisé est présenté sur la Figure 5-1. Il correspond à un montage classique d'électrofilage (Chapitre 2, Figure 2-1, page 35) dont la configuration du collecteur a été optimisée afin de déposer les filaments de manière homogène sur les lamelles. Le collecteur, relié à la masse électrique, est composé d'une tige métallique et d'un disque recouvert d'aluminium. Lors de l'électrofilage, la lamelle est déposée sur l'extrémité d'une tige métallique de même diamètre. La présence de la tige métallique permet de maintenir un champ électrique maximal entre l'aiguille et la lamelle, et ainsi diriger les filaments à la surface de celle-ci. Cependant, les filaments ont tendance à se déposer essentiellement sur la périphérie de la lamelle. Cela est sûrement lié à un effet de bord qui induit localement une augmentation du champ électrique. La mise en place d'un disque d'aluminium autour de la tige, et sur un plan éloigné par rapport à la zone de filage, a permis de compenser cet effet de bord et de produire un dépôt uniforme sur les lamelles (Figure 5-1). Celui-ci a été positionné 2 à 3 cm plus bas que l'extrémité de la tige.



*Figure 5-1 Montage d'électrofilage utilisé pour réaliser un dépôt homogène de filaments sur lamelle de culture cellulaire.* 

Les essais d'électrofilage ont été réalisés sous une sorbonne ventilée dans des conditions non stériles. Les conditions utilisées pour chaque solution sont indiquées dans le Tableau 5-2. La distance de travail a été fixée à 10 cm pour tous les essais. Le débit a d'abord été fixé à 1 mL/h mais a dû être adapté pour les solutions contenant l'HGF. En effet, l'électrofilage des solutions d'HGF s'est révélé être plus compliqué que pour les solutions sans protéine. Ainsi, afin d'éviter des conditions instables où du multijet apparait de manière intempestive, le débit a été réduit à 0,25 mL/h. Les tensions permettant d'obtenir un filage stable et durable sont de 5,3 et 5,5 kV. La durée de dépôt n'a pas été fixée en fonction du débit de solution utilisé car le comportement du jet varie de manière importante entre les solutions contenant ou non la protéine. Il a donc été optimisé pour chaque solution afin d'obtenir une quantité de filaments semblable pour chaque échantillon. Les différentes solutions produisent un jet dont le lasso est plus ou moins large ce qui implique que la surface sur laquelle se dépose le filament sur le disque d'aluminium est plus ou moins étendue. Ainsi, la vitesse de dépôt sur la lamelle n'est pas la même pour chaque solution. La quantité de filaments étant très faible, les échantillons n'ont pas été caractérisés par la pesée. Ceux-ci ont été comparés en fonction du taux de recouvrement de la lamelle par les filaments visible par imagerie optique. Les taux de recouvrements obtenus entre les échantillons ont été ajustés en fonction du temps de dépôt. Pour la solution de PLGA par exemple, un temps de dépôt assez long (entre 3 et 4 minutes) était nécessaire pour recouvrir la lamelle alors que pour la solution de PLGA+HGF10X, 15 secondes était nécessaires (0,25 minute) (Tableau 5-2). Sur une même journée, des temps de dépôt fixes ont été utilisés pour chaque solution. Néanmoins, les conditions de filage étaient parfois modifiées sur différents jours en fonction des conditions d'humidité ou de température. Ainsi, le temps a parfois été de nouveau ajusté comme dans le cas de la solution de PLGA pour laquelle la durée du filage a varié entre 3 et 4 minutes suivant les essais.

Solution	Distance de travail (cm)	Débit (mL/h)	Tension (kV)	Temps de dépôt (min)
PLGA	10	1,00	5,3	3,00-4,00
PLGA + HGF1X	10	0,25	5,3	0,16-0,25
PLGA + HGF10X	10	0,25	5,5	0,25

Tableau 5-2 Liste des paramètres utilisés en électrofilage pour le dépôt de filaments sur des lamelles de culture cellulaire.

Afin de caractériser de manière plus précise le taux de recouvrement de la lamelle, les images optiques des dépôts ont été traitées par le logiciel Image J (Annexe 14). Afin que le logiciel puisse détecter la surface occupée par les filaments, les images colorées ont été transformées en échelle de gris puis ont été binarisées en blanc et noir. Par la suite, le logiciel a pu calculer le nombre de pixels de couleur noire pour en déduire le pourcentage surfacique occupé par les filaments. Le taux de recouvrement surfacique est de 30 % pour les filaments de PLGA, 22% pour les filaments de PLGA avec HGF 1X et de 20% pour les filaments de PLGA avec HGF10X.

Les essais ayant été réalisés sous sorbonne, la température et l'humidité n'ont pas été contrôlées. Ces paramètres ont respectivement varié entre 20 et 24°C et 53-60%.

> Membrane multicouche : dépôt sur aluminium

Des dépôts de filaments sur feuille d'aluminium ont été réalisés. Ces échantillons ont l'avantage de contenir une quantité plus importante de filaments que l'on peut détacher du support pour disposer d'un échantillon autosupporté, qui peut être pesé avec précision. Ainsi, les temps de dépôt ont été optimisés pour produire des échantillons de masses équivalentes à partir des différentes solutions (Tableau 5-3). Des comparaisons fiables pourront alors être réalisées entre les différents échantillons. Le débit de solution et la concentration en PLGA étant constants entre les solutions, le temps de dépôt a été fixé à 3,66 min. La distance de travail a été optimisée afin de produire des dépôts de filaments de diamètre équivalent. L'intérêt est de pouvoir calibrer la taille des échantillons qui doivent être introduits dans les puits de culture cellulaire. Ainsi, la distance de travail pour la solution de PLGA a été fixée à 7,5 cm, et à 5 cm pour les solutions contenant la protéine. La tension optimale appliquée à l'aiguille varie de 4,6 à 5 kV en fonction des solutions.

Solution	Distance de travail (cm)	Débit (mL/h)	Tension (kV)	Temps de dépôt (min)	Masse membrane (mg)	Masse d'HGF (ng)	Diamètre membrane (cm)
PLGA	7,5	1	4,6-4,9	3,66	6	0	5,0
PLGA + HGF1X	5,5	1	5,0	3,66	6	3,4	5,5
PLGA + HGF10X	5,0	1	5,0	3,66	6	33,4	5,5
PLGA + HGF10X M2	5,0	1	5,0	6,50	10	55,6	5,5

Tableau 5-3 Liste des paramètres d'électrofilage pour la production d'échantillons autosupportés.

Afin de produire des échantillons de manière reproductible, ceux-ci ont été générés au sein de l'imprimante, sur le collecteur amovible (Figure 5-2). Le collecteur a été recouvert de papier aluminium et un GCode a été programmé afin de réaliser entre 56 et 64 membranes sur une même feuille d'aluminium. Le GCode intègre des déplacements dans le plan et une pause de 3,66 min pendant laquelle chaque échantillon est fabriqué.



*Figure 5-2 Image du montage d'électrofilage utilisé dans l'enceinte de l'imprimante pour produire des membranes de filaments de manière reproductible.* 

Après séparation du support de fabrication et séchage (protocole présenté ci-après), les membranes pèsent toutes environ 6 mg. Des membranes de PLGA HGF10X de 10 mg ont aussi été produites pour les tests de libération de l'HGF. Les membranes de 6 mg contiennent respectivement 3,4 et 33,4 ng d'HGF pour les échantillons de PLGA HGF1X et HGF10X. Les membranes de PLGA HGF10X de 10 mg (notées « M2 ») contiennent 55,6 ng. Ces teneurs en HGF dans les échantillons ont été fixées afin d'obtenir des concentrations proches de celles conseillées par le fournisseur, qui est de 20 ng/mL.

La température et l'humidité auraient pu être fixées au sein de l'enceinte de l'imprimante. Néanmoins, afin de limiter la formation de multiples jets à la pointe de l'aiguille, les régulations de température et d'humidité ont été arrêtées. La température a varié de 20 à 26°C et l'humidité de 45 à 60%.

#### 1.2.3 Caractérisation des filaments

#### Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les observations par microscopie électronique à balayage ont été réalisées sur un microscope Merlin Compact (Zeiss) disponible sur la plateforme technologique CTµ (Centre Technologique des Microsctructures). Les filaments déposés ont été découpés puis collés à l'aide d'un scotch carbone sur un plot de MEB (diamètre 1 cm). Ils ont ensuite été métallisés avec une couche de 10 nm de cuivre par pulvérisation cathodique (appareil BALTEC MED-020).

Certaines observations ont également été réalisées sur des échantillons contenant des cellules, après fixation des cellules à partir de formaldéhyde et déshydratation à partir d'éthanol.

#### > Analyse thermogravimétrique (ATG)

Des analyses thermogravimétriques (appareil Mettler Toledo TGA/SDSC 851) ont été réalisées sur la Plateforme Lyonnaise d'Analyse Thermique (PLAT, LMI) afin de déterminer le pourcentage de solvant résiduel au sein des filaments. L'analyse ATG a été réalisée sous air de 25 à 200°C avec une rampe de 5°C/min.

> Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Les analyses de Calorimétrie à balayage (DSC) (appareil Mettler Toledo DSC1) ont été réalisées sous azote sur les filaments de polymère afin de connaître l'influence de la stérilisation sur la masse molaire du polymère. Les analyses comportent un premier chauffage de 0 à 220°C, puis un refroidissement de 220 à -40°C et un second chauffage jusqu'à 220°C, avec une rampe de 10°C/min.

#### 1.2.4 Protocole de séchage

Une grande partie du solvant est évaporée lors de l'étirage du filament sous champ électrique mais les filaments obtenus peuvent ne pas être complètement secs. Le pourcentage de solvant résiduel n'est pas un paramètre souvent pris en compte dans la littérature. Pourtant, les solvants organiques sont souvent toxiques et peuvent induire un effet cytotoxique pour les cellules ou même induire un comportement cellulaire différent. Afin de limiter la présence de solvant HFIP au sein des filaments jusqu'à l'état de trace, un protocole de séchage a été mis en place. Ainsi, l'objectif était d'obtenir des membranes les plus pures possibles, avec moins de 1% de solvant. Pour cela, des analyses ATG ont été effectuées sur des filaments directement après filage et après séchage. L'HFIP possède une température d'évaporation de 58°C à pression atmosphérique. Le pourcentage de solvant résiduel a donc été déterminé à partir de la perte de masse obtenue entre 25 et 80°C.

Toutes les courbes ATG sont présentées en Annexe 15 et Annexe 16 et les pourcentages de perte de masse sont présentés en Tableau 5-4. Les filaments de PLGA produits la vieille par électrofilage ont présenté une perte de masse de 10% à 60°C. Différentes conditions de séchage ont donc été testées : séchage des filaments sous vide à 40°C, séchage des filaments dans une étuve à 40°C pendant 4 ou 6 jours. Une perte de masse de 5,2% a été obtenue sur des filaments après 1 nuit de séchage sous vide à 40°C. Après 4 et 6 jours de séchage à 40°C, la perte de masse est respectivement de 2% et 0,87%.

#### Tableau 5-4 Pourcentage de perte de masse par ATG des filaments de PLGA au cours du chauffage de 25 à 80°C.

1 nuit à 40°C sous vide	4 jours à 40°C	6 jours à 40°C
5,24%	2,03%	0,87%

Le protocole de séchage permettant de sécher les filaments de PLGA pour ne laisser le solvant qu'à l'état de trace correspond donc à 6 jours de séchage dans une étuve chauffée à 40°C. L'extraction de l'étuve est reliée à une sorbonne de manière à sécuriser l'espace de travail. Ce protocole permet aussi de sécher les filaments de PLGA contenant 1 ou 10X d'HGF jusqu'à moins de 1% d'HFIP.

#### 1.2.5 Protocole de stérilisation

De nombreux protocoles de stérilisation sont utilisés dans la littérature. Les plus communs et faciles à mettre en place sont la stérilisation par immersion dans l'éthanol ou dans des solutions d'antibiotiques et antifongiques, ou encore par exposition au rayonnement ultraviolet (UV).[170] Ces trois méthodes de stérilisation ont alors été testées. Voici les protocoles utilisés après avoir ajouté les échantillons dans les puits de culture, sous une hotte à flux laminaire :

- <u>Stérilisation par l'éthanol</u> : Ajout de 1mL d'éthanol à 70% dans chaque puits. Après 30min de contact, les échantillons sont rincés trois fois au PBS 1X.
- <u>Stérilisation par les solutions d'antibiotiques et antifongiques</u> : Ajout de 1mL de solution antibiotique/antifongique. Après 1h30 de contact, les échantillons sont rincés trois fois aux PBS 1X.
- <u>Stérilisation par UV</u> : Les échantillons sont placés sous une lampe UV de 15W à 254 nm à une distance de 15 cm pendant 40 minutes.

#### 1.2.6 Préparation des échantillons pour la culture cellulaire

Pour ces cultures cellulaires, la lignée cellulaire HepG2 a été utilisée. Il s'agit de cellules tumorales du foie très utilisées pour étudier les fonctions métaboliques et la toxicité de certains agents sur les cellules hépatiques.

Après séchage, les lamelles recouvertes de filaments sont directement introduites dans les puits de culture stériles. Les membranes multicouches (échantillons autosupportés) sont décollées de l'aluminium et déposées sur une lamelle. Les bords de la membrane sont rabattus sous la lamelle afin de fixer la membrane. Le tout est introduit dans les puits de culture et maintenu au fond par des joints en PTFE dont le diamètre est similaire au diamètre des puits. Les échantillons sont stérilisés après avoir été placés dans les puits de culture.

Par la suite, les cellules servant à ensemencer les échantillons sont décollées de leur puits de culture par l'ajout de trypsine<sup>7</sup> puis sont rincées. Le nombre de cellules par unité de volume est déterminé par un appareil de comptage cellulaire. Les cellules sont ensuite diluées en fonction de la densité cellulaire désirée ( $2.10^4$ - $8.10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>) avant de les introduire dans les différents puits de culture. La culture cellulaire est maintenue pendant 5 jours dans un incubateur à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> et 95% d'humidité. Le milieu de culture, de volume total de 0,5 mL, est renouvelé tous les deux jours.

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> La trypsine est un agent enzymatique de dissociation cellulaire. Il permet de rompre les liaisons entre les cellules et leur support par digestion de la matrice extracellulaire.

#### 1.2.7 Caractérisation des essais biologiques

#### Test de prolifération WST-8

L'activité métabolique des cellules a pu être déterminée par un test WST-8. Il s'agit d'un test colorimétrique qui utilise un sel de tetrazonium (sel *WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium]*) non coloré qui est capable de se réduire en molécule colorée en présence d'une enzyme (NADH, *Nicotinamide adenine dinucleotide*) produit par les mitochondries. Cette réaction se fait en milieu extracellulaire. La quantité de molécules colorées produite est directement reliée à l'activité métabolique de la cellule qui est un marqueur de la prolifération cellulaire.

Le réactif WST-8 est ajouté dans le milieu de culture en présence de cellules et est laissé incubé pendant plusieurs heures afin que la réaction s'opère. Après réaction, le milieu de culture est prélevé et introduit dans une autre plaque. L'absorbance du milieu à 450 nm de chaque puit correspondant à un échantillon est déterminée par un spectrophotomètre adapté ou « lecteur de plaque ».

Lors de ces essais, chaque condition a été testée selon des échantillons dupliqués.

Visualisation des cellules mortes par « Live/dead assay »

Le test « Live/dead » est un test permettant de visualiser la quantité totale de cellules, et de discriminer les cellules vivantes des cellules mortes par microscopie de fluorescence. Pour cela, trois marqueurs fluorescents sont utilisés : « Hoechst » qui marque le noyau de toutes les cellules présentes, « Calcein AM » qui marque le cytoplasme de cellules vivantes et « PI » qui marque le noyau de cellules mortes. Ce test est réalisé à la fin de la culture cellulaire.

> Concentration de l'HGF en solution déterminée à partir d'un test ELISA

La concentration de la protéine HGF dans le milieu de culture peut être déterminée par test ELISA (sandwich enzyme-linked immunosorbent assay). Ce test permet de détecter de manière spécifique la protéine par immunoabsorption. Cette réaction anticorps-antigène est ensuite révélée par la production d'une molécule colorée.

Le kit ELISA utilisé est composé d'une plaque de puits au fond desquels un anticorps spécifique à l'HGF est adsorbé. Le test consiste alors à introduire le milieu à analyser au sein d'un puits. L'HGF présent dans le milieu va alors se fixer spécifiquement sur l'anticorps. Les puits sont ensuite rincés et un anticorps secondaire de l'HGF couplé à une enzyme est ajouté. Celui-ci va aussi se fixer sur la protéine HGF pour former un complexe « sandwich ». Après rinçage, une solution est ajoutée. Celle-ci contient une molécule qui va réagir avec l'enzyme pour former une molécule colorée. La quantité de molécules colorées sera alors proportionnelle à la quantité d'HGF fixée.

L'absorbance des échantillons testés a été mesurée en parallèle de celle des échantillons références dans lesquels la quantité d'HGF était connue. A partir d'une droite d'étalonnage reliant l'absorbance à la concentration de la protéine entre 0,125 et 8 ng/mL, la concentration de l'HGF a pu être déterminée dans cette gamme de linéarité.

> Voie d'activation du récepteur MET par WESTERN BLOT et PCR

L'influence de l'HGF sur les cellules HepG2 correspond à l'interaction que la protéine a eue avec les cellules. Cette interaction déclenche alors un processus intracellulaire en cascade résultant par l'expression de gènes spécifiques et la production de protéines spécifiques. La protéine HGF est

connue pour induire la phosphorylation du récepteur membranaire c-Met des cellules HepG2. La reconnaissance de l'HGF par les cellules HepG2 induit aussi la surexpression et la sous-expression de certains gènes comme les gènes P16 ou Id1 (Figure 5-3).

Le Western Blot est une technique de transfert et de séparation de protéines totales. Il permet de détecter spécifiquement une protéine ou une de ses isoformes dans un mélange complexe de protéines présentes dans le milieu ou au sein des cellules. Cette technique est alors utilisée pour détecter la phosphorylation du récepteur c-Met qui est une protéine. Avant le test, les échantillons sont préparés afin d'obtenir un mélange de tous les composants des cellules : les membranes cellulaires sont rompues et les protéines sont dénaturées. Les protéines sont ensuite séparées sur gel d'électrophorèse en fonction de leur taille, puis transférées sur membrane en PVDF (poly (fluorure de vinylidène)). L'ensemble des protéines présentes sur la membrane est coloré par méthode « Ponceau Red » pour vérifier que le transfert a été effectué de manière homogène. Après lavage, la membrane est ensuite mise en contact avec un ou plusieurs anticorps primaires qui vont se fixer sur les protéines que nous souhaitons détecter. La membrane est ensuite mise en contact un anticorps secondaire (dirigé contre l'anticorps primaire) couplé à une enzyme horseradish peroxidase (HRP) capable de révéler la présence de la protéine ciblée. La révélation de la présence de la protéine ciblée se fait par l'émission d'une lumière provenant de l'ajout d'une solution contenant un substrat à l'enzyme HRP chemiluminescent (Dura, ThermoFisher Scientific) sur la membrane.

La méthode PCR (Polymerase Chain Reaction) est un test permettant de détecter des séquences d'ADN spécifiques présentes dans les cellules. Cette méthode a été utilisée pour détecter les gènes exprimés lorsque les cellules interagissent avec HGF. La méthode est basée sur l'amplification de la séquence d'ADN ciblée suivant plusieurs cycles de température. A la fin de chaque cycle, une molécule intercalent s'associent aux doubles brins d'ADN amplifiés. Ainsi, un certain nombre de cycles doit être atteint afin de collecter suffisamment de molécules détectables. L'amplification du brin d'ADN est effectuée par l'enzyme polymérase guidée par des amorces fixées sur la séquence d'ADN cible. Afin de vérifier l'interaction de l'HGF avec le récepteur MET, les gènes Id1, P16, CycD1 et ATP ont été analysés (Figure 5-3). Les gènes Id1 [171], CycD1 [172], [173] et de l'ATP devraient être sous exprimés par l'interaction avec HGF alors que les gènes P16 devraient être surexprimés [171].



Figure 5-3 Voie signalétique d'activation du récepteur c-Met par HGF

#### 1.3 Optimisation du protocole de stérilisation et cytotoxicité

Une première série de cultures cellulaires a été réalisée dans le but d'optimiser les conditions de culture avant d'étudier l'effet biologique des filaments. La cytotoxicité des filaments a alors été évaluée après 5 jours de culture, puis des essais ont été réalisés afin de choisir la méthode de stérilisation la plus adaptée et la moins agressive pour les échantillons.

#### 1.3.1 Cytotoxicité des filaments sur les cellules HepG2

La cytotoxicité des filaments a été étudiée en combinant un test de prolifération WST-8 et un test de cytotoxicité comme le test « Live/dead ». Ces tests ont été réalisés sur les échantillons correspondant à des membranes monocouches (lamelles recouvertes de filaments). Les cultures cellulaires ont été réalisées après stérilisation des échantillons aux UV. Les filaments de PLGA ont révélé un comportement (connu) plutôt hydrophobe impliquant que le milieu de culture mouille difficilement les filaments au début de la culture. Après incubation des filaments dans le milieu de culture après plusieurs jours, la surface des filaments a tendance à s'hydrolyser et donc à devenir plus hydrophile. Afin d'éviter que la surface hydrophobe des filaments en début de culture induise une cytotoxicité et ne permette pas aux cellules d'adhérer convenablement, un dépôt de collagène de type I a été rajouté à la surface des filaments de PLGA avec et sans dépôt de collagène ont été testés et ont été comparés à des échantillons « contrôle » qui correspondent à des lamelles seules avec et sans dépôt de collagène. Les résultats du test WST-8 sont présentés en Figure 5-4.



Figure 5-4 Résultat du test de WST-8 réalisé sur des filaments avec ou sans collagène

Les valeurs d'absorbance ont été converties en pourcentage d'activité métabolique (AM). Ce paramètre est utilisé pour normaliser les valeurs obtenues et pouvoir comparer les échantillons entre eux. Dans ce cas, l'échantillon « Contrôle + collagène » a été pris pour référence dans le calcul de l'AM. C'est pourquoi cet échantillon possède 100% d'AM. Les valeurs d'AM présentées correspondent à la moyenne obtenue sur les échantillons dupliqués. La barre d'erreur correspond à la valeur maximale et minimale obtenues.

La variation d'AM entre les échantillons est de ± 10% au maximum, ce qui reste raisonnable. Ces résultats semblent donc assez fiables. Il est possible de remarquer que le dépôt de collagène permet de stimuler l'activité cellulaire. Dans le cas du contrôle, l'ajout de collagène a permis d'augmenter de 80% l'AM et dans le cas des filaments, l'ajout de collagène a permis d'augmenter l'AM d'environ 70%. L'ajout de collagène est donc intéressant pour augmenter la prolifération cellulaire en rendant plus

hydrophile la surface de contact. La présence de filaments dans les puits de culture semble aussi avoir une influence sur la prolifération cellulaire. La présence de filament permet d'augmenter l'AM d'environ 25% avec et sans dépôt de collagène. Dans ce cas, c'est la texturation de la surface qui possède un effet positif comme cela a déjà été démontré dans la littérature [35], [174]

Les images obtenues par microscopie de fluorescence du test « Live/dead » après 5 jours de culture sont présentées en Figure 5-5.



Figure 5-5 Images optiques de microscopie par fluorescence et par lumière transmise des échantillons après 5 jours de culture des HepG2. La même région a été éclairée par différentes lumières afin de révéler la fluorescence des trois marqueurs et révéler la forme des cellules. Le fluorophore Hoechst en bleu marque le noyau de l'ensemble des cellules. La Calcein AM en vert marque le cytoplasme des cellules vivantes et le PI en rouge marque le noyau des cellules mortes. Barre d'échelle : 50µm.

Le marqueur bleu Hoechst marque l'ensemble des noyaux des cellules présentes. A part pour l'échantillon « contrôle » qui ne présente pas beaucoup de cellules, il est possible d'observer une quantité importante de cellules dans toutes les conditions. Cela montre donc que, hormis sur lamelle, les cellules sont capables de proliférer sur une surface recouverte de collagène ou sur des filaments de PLGA. Ces résultats confirment ceux obtenus à partir du test de prolifération car dans ce cas aussi, les échantillons avec dépôt de collagène semblent contenir un nombre plus important de cellules. Les deux autres marqueurs fluorescents permettent de savoir si les cellules détectées par le marqueur bleu sont vivantes (marqueur Calcein AM en vert) ou mortes (marqueur PI rouge). Concernant les échantillons avec dépôt de collagène (« Fil-PLGA + collagène » et « contrôle + collagène »), il est possible de noter que les cellules présentes ont été marquées par le Calcein AM et sont donc vivantes. Seul l'échantillon contenant les filaments de PLGA sans dépôt de collagène (« Fil-PLGA »), n'a pas présenté de cellules vivantes mais des cellules mortes marquées par le marqueur PI en rouge. Il semblerait donc que les filaments de PLGA provoquent la mort d'une partie des cellules présentes dans le puits de culture. Ces résultats sont surprenants car le PLGA est un polymère connu dans la littérature

pour sa biocompatibilité [10], [18], [175]. Néanmoins, ces résultats ne remettent peut-être pas en question le caractère biocompatible et inerte du PLGA. Dans la littérature, il a été montré que les biomatériaux d'origine synthétique permettent difficilement aux cellules d'adhérer à cause de l'absence de récepteur d'adhésion. Pour adhérer à une surface, les cellules produisent des protéines à la surface de leur membrane qui se lient à des récepteurs spécifiques. En l'absence de récepteurs sur une surface, les cellules adhèrent difficilement et peuvent, par conséquent, mourir. Pour éviter ce phénomène, des séquences peptidiques RGD (R : arginine ; G : glycine ; D : acide aspartique) sont régulièrement intégrés dans les matériaux synthétiques [176]. Ces séquences peptidiques permettent d'augmenter l'adhésion cellulaire grâce à leur grande affinité avec les protéines transmembranaires comme les intégrines. Des séquences peptidiques RGD sont présentes dans le collagène. Cela peut donc expliquer pourquoi les cellules prolifèrent de manière importante sur les échantillons avec dépôt de collagène.

Afin d'éviter que les cellules ne meurent et puisse adhérer convenablement sur les filaments de PLGA, les filaments ont tous été recouverts d'un dépôt de collagène avant la culture cellulaire.

#### 1.3.2 Choix de la méthode de stérilisation des échantillons

Les trois méthodes de stérilisation (décrites dans la partie 1.2.5) ont été testées afin de choisir celle qui permet de stériliser efficacement les échantillons tout en évitant une dégradation trop importante des filaments. En effet, une modification de la morphologie, une diminution de diamètre ou une diminution de la masse molaire du polymère après stérilisation ont déjà pu être observées dans la littérature [177], [178]. Les échantillons étudiés correspondent à des filaments de PLGA et de PLGA + HGF1X. Les filaments de PLGA 10X n'ont pas été étudiés car ils ont été introduits plus tard dans l'étude.

Influence de la stérilisation sur la morphologie et les propriétés physico-chimiques des filaments

Des analyses ont été réalisées afin de vérifier l'influence des méthodes de stérilisation sur le diamètre et la morphologie des filaments ainsi que sur leurs propriétés physico-chimiques. Pour cela, les diamètres des filaments ont été mesurés par MEB et les propriétés physico-chimiques ont été étudiées à partir d'analyses DSC.

Les images MEB des différents échantillons de filaments sont présentées en Figure 5-6. Les filaments contenant de l'HGF sont plus fins que les filaments de PLGA seul, ce qui est toujours le cas après n'importe quel traitement de stérilisation. Les filaments de PLGA présentent à leur surface une rugosité sous la forme de pores de faible profondeur. Cette texturation particulière étant visible avant et après stérilisation, elle n'est donc pas liée à la méthode de stérilisation. Des images MEB acquises sur des filaments de PLGA avant séchage (Figure 5-6) ont montré une surface complètement lisse. Il est donc possible que l'apparition de ces reliefs en surface soit liée à l'évaporation rapide du solvant résiduel pendant l'étape de séchage. La présence de porosité à la surface des filaments a déjà été mise en évidence dans la littérature et a été relié à l'évaporation du solvant [69]. Les filaments PLGA + HGF1X étant beaucoup plus fins, les reliefs de la surface sont plus difficilement perceptibles.



Figure 5-6 Images MEB des différents échantillons de filaments de PLGA avec et sans HGF après stérilisation par bain d'éthanol, d'antibiotique, ou aux UV. Des images MEB de PLGA qui n'ont pas été séchés sont aussi présentes. La barre d'échelle pour les images de faible grossissement est de 10 μm et la barre d'échelle pour les images à fort grossissement est de 1 μm.

Les différentes conditions de stérilisation ne semblent pas avoir induit de modification majeure dans la morphologie des filaments : les filaments avant et après stérilisation sont très similaires. Les diamètres mesurés à partir des images MEB sont présentés en Figure 5-7. Les filaments de PLGA mesurent environs  $1,7 \pm 0,6 \mu m$  et les filaments de PLGA HGF1X mesurent environs  $0,9 \pm 0,3 \mu m$  de

diamètre quel que soit la méthode de stérilisation. Ces résultats confirment aussi la différence de diamètre marquée entre les filaments avec et sans HGF. Les filaments contenant l'HGF sont significativement plus fins. Cette tendance avait déjà été remarquée dans le Chapitre 4 avec les filaments de PLGA contenant de la protéine BSA. La différence de diamètre pourrait dans ce cas aussi être liée à la présence de l'HGF, cependant les deux solutions ont été filées à partir de deux débits différents (Tableau 5-2). La solution de PLGA avec HGF a été filée à partir d'un débit de 0,25 mL/h alors que la solution de PLGA a été filée à un débit de 1 mL/h. Cette différence de débit pourrait aussi expliquer pourquoi les filaments de PLGA avec HGF sont plus fins.



Figure 5-7 Résultats des diamètres moyens obtenus sur des filaments de PLGA contenant ou non de l'HGF, après ou sans stérilisation. La moyenne de diamètre a été réalisée à partir d'une dizaine de diamètres différents. Les barres d'erreur correspondent au diamètre maximal et minimal mesuré.

Des analyses DSC ont été effectuées afin de vérifier que les propriétés physico-chimiques des filaments n'ont pas été modifiées de manière importante. Cela a été effectué en mesurant la température de transition vitreuse (Tg). La Tg peut en effet apporter des informations sur l'histoire thermique et mécanique du matériau. Les courbes obtenues par analyse DSC sur les filaments de PLGA stérilisés sont présentées en Annexe 17 et Annexe 18. La Tg a ainsi été mesurée durant les trois segments du cycle thermique, à savoir lors du premier chauffage, du refroidissement puis du second chauffage. La Tg correspond à la température la plus faible à laquelle la courbe présente un phénomène endothermique, avec une différence de hauteur de ligne de base de part et d'autre du phénomène. Un changement de pente peut aussi être observé. En traçant la tangente des deux pentes (avant et après Tg), la Tg peut être déterminée de manière assez précise. Les résultats de Tg obtenue sont exposés en Figure 5-8.



Figure 5-8 Résultats de température de transition vitreuse déterminée par l'analyse DSC de filaments de PLGA après avoir été stérilisés ou non par les trois méthodes.

Au niveau du premier chauffage, la Tg (onset) du PLGA varie entre 58°C et 60°C entre chaque condition de stérilisation. Lors du refroidissement, elle varie de 58 à 60 °C et pour le second chauffage, celle-ci est d'environ 55°C pour toutes les conditions. Les Tg obtenues au premier chauffage varient légèrement en fonction des conditions de stérilisation, ce qui est moins le cas lors du second chauffage. La Tg obtenue au premier chauffage dépend de manière importante de l'histoire thermique et mécanique du matériau, ce qui pourrait expliquer les légères différences observées. Ainsi, un fort phénomène endothermique est visible dans le prolongement du phénomène de transition vitreuse, il s'agit d'un phénomène de relaxation des chaînes de polymère qui ont été étirées et figées dans cette configuration durant l'étape de mise en forme par électrofilage. Le premier chauffage permet donc d'éliminer ce phénomène qui n'est plus visible sur les autres thermogrammes. La Tg obtenue au deuxième chauffage, dépend seulement des caractéristiques du polymère comme sa composition chimique et sa masse molaire. Dans ce cas, la Tg est presque identique pour chaque condition testée. Cela indique donc que la stérilisation n'induit pas de modification importante de la masse molaire du PLGA. Il semblerait que les trois stérilisations n'induisent pas de modifications importantes des propriétés physico-chimiques des filaments.

Influence de la stérilisation sur la culture cellulaire

Afin de caractériser l'influence des méthodes de stérilisation sur les propriétés biologiques, des cultures cellulaires sur une période de 5 jours ont été réalisées avec les échantillons stérilisés. Cette influence a été étudiée par analyse de la prolifération cellulaire et de la cytotoxicité des échantillons par un test WST-8 et un test « Live/dead », respectivement. L'influence de la méthode de stérilisation sur la morphologie des filaments et des cellules a pu être vérifiée à partir d'imagerie par MEB. Les échantillons correspondent à des filaments de PLGA contenant ou non l'HGF. Les échantillons « contrôle » correspondent à des lamelles seules avec ou sans HGF dans le milieu de culture. La concentration de l'HGF a été fixée à 20 ng/mL selon les recommandations du fournisseur de la protéine (Peprotech).

Une contamination biologique induit la mort des cellules et peut être remarquée par un changement de couleur prononcé du milieu DMEM de culture. Les milieux de cultures utilisés contiennent effectivement un indicateur coloré pouvant changer de couleur lorsque la majorité des cellules est morte. L'ensemble des cultures cellulaire réalisées n'a présenté aucune contamination biologique, même après 5 jours. Cette observation réalisée au cours des essais est une première indication montrant que les trois méthodes de stérilisation sont efficaces pour prévenir les contaminations bactériennes et fongiques.

La caractérisation des échantillons s'est poursuivie afin de connaître l'influence des stérilisations sur le comportement cellulaire. Les résultats du test de prolifération WST-8 sont présentés en Figure 5-9. De manière générale, les échantillons stérilisés par solution d'éthanol ou d'antibiotique semblent présenter une AM plus importante que les échantillons stérilisés aux UV : l'AM varie de 60 à 100% pour les stérilisations à l'éthanol et aux solutions d'antibiotique et elle varie de 40 à 70% pour la stérilisation aux UV. Il semblerait donc que les stérilisations à l'éthanol ou aux antibiotiques permettent d'augmenter l'affinité des cellules pour le substrat, ce qui a pour conséquence une augmentation de l'AM des cellules.



Figure 5-9 Pourcentages d'AM des HepG2 obtenus à partir d'un test WST-8 après 5 jours de culture sur des échantillons stérilisés à partir de trois méthodes différentes : éthanol (en vert), solution d'antibiotique (en jaune) et UV (en bleu).

Les échantillons « contrôle » avec et sans HGF dans le milieu, montrent la même tendance quelle que soit la méthode de stérilisation : l'échantillon contenant HGF dans le milieu présente une AM d'environ 30% de moins que l'échantillon sans HGF. Cela confirme donc l'effet antiprolifératif de la protéine HGF attendu sur les cellules HepG2. En émettant l'hypothèse que l'HGF présent dans les filaments soit libéré dans le milieu de culture, la même tendance devrait être observée entre les filaments de PLGA contenant ou non la protéine. Aucun effet antiprolifératif n'est observé dans le cas des filaments HGF1X stérilisés par une solution d'éthanol. Au contraire, l'AM est plus importante d'environ 10% sur l'échantillon contenant les filaments HGF1X. Néanmoins, l'effet antiprolifératif des filaments PLGA + HGF1X est observé sur les échantillons stérilisés par solutions d'antibiotiques, l'effet est de 10%. Dans le cas de la stérilisation UV, l'effet antiprolifératif est beaucoup plus marqué : tout comme les échantillons « contrôle », il est de 30%.

Les images acquises par microscopie de fluorescence à partir de l'expérience faite par « Live/dead » sont présentées en Annexe 19 et Annexe 20. Il est possible de remarquer qu'aucun échantillon n'induit de cytotoxicité sur les cellules HepG2 car aucune fluorescence du marqueur PI n'est révélée. L'ensemble des cellules observées sont donc majoritairement vivantes.

Les images acquises par MEB sur l'ensemble des conditions testées sont présentées sur la même figure (Annexe 19 et Annexe 20). Celles des échantillons « contrôle » sans filaments confirment les tendances d'AM obtenues par le test WST-8. Il est, par exemple, possible de remarquer une densité cellulaire moins importante sur les échantillons stérilisés aux UV, comme dans le cas du test de prolifération.

Pour les échantillons contenant les filaments, il est plus difficile de comparer visuellement la densité cellulaire. Concernant la morphologie des cellules, celle-ci ne semble pas être différente entre les différentes conditions testées. Il est, néanmoins, possible de remarquer que les cellules semblent adhérer spécifiquement sur la surface des filaments. Les cellules présentent une forme plus étirée lorsqu'elles sont en contact avec les filaments. Celles-ci ont développé davantage de pseudopodes en contact avec la surface des filaments (Annexe 20). La morphologie des cellules semble alors s'adapter à l'orientation des filaments sur lesquels elles ont adhéré.

#### 1.3.3 Conclusion

## Les différents tests présentés dans cette partie ont permis de trouver les conditions qui permettront de tester de manière optimale l'effet biologique des filaments de PLGA contenant HGF sur les cellules HepG2.

Les tests de cytotoxicité par microscopie de fluorescence ont d'abord montré que les cellules étaient capables de proliférer à la surface des filaments de PLGA mais finissent par mourir sûrement par manque d'adhésion. D'après les informations présentes dans la littérature, il semblerait que certaines cellules parviennent difficilement à adhérer à la surface de polymère synthétique comme le PLGA. Ce manque d'adhésion est lié au manque de récepteurs membranaires comme les séquences peptidiques RGD. Cette hypothèse a été confirmée puisqu'avec un dépôt de collagène contenant des motifs RGD, les cellules ont pu adhérer à la surface des filaments et proliférer. **Par la suite, tous les échantillons ont été recouverts d'un dépôt de collagène.** 

Les tests réalisés à partir de trois méthodes de stérilisation ont permis de caractériser de manière approfondie les filaments. Les observations MEB ont d'abord permis de visualiser la porosité de surface des filaments de PLGA. Cette porosité est sûrement liée à la vitesse d'évaporation importante du solvant HFIP lors de l'étape de séchage. Les filaments de PLGA possèdent un diamètre moyen de 1,7  $\pm$  0,6 µm alors que les filaments de PLGA contenant l'HGF possèdent un diamètre moyen presque deux fois moins important, de 0,9  $\pm$  0,3 µm. **Cette différence de diamètre est soit liée à l'ajout de protéine en solution qui peut augmenter la conductivité de la solution, soit à la différence de débit utilisé. La température de transition vitreuse a aussi été déterminée à environ 60°C par analyse DSC. Les tests ont montré que les stérilisations par éthanol, antibiotique ou UV n'ont aucune influence visible sur ces caractéristiques : la morphologie, le diamètre des filaments et la température de transition vitreuse du polymère n'ont pas été modifiés.** 

Les cultures cellulaires réalisées dans le cadre de l'étude des stérilisations, ont aussi pu montrer comment se comportent les cellules HepG2 en présence des différents types de filaments. Sur les observations au MEB, les cellules semblent bien adhérer à la surface des filaments de PLGA et de PLGA contenant HGF1X. Celles-ci ont développé des pseudopodes qui leur ont permis de se fixer sur plusieurs filaments à la fois. Au niveau comportement cellulaire, seule une différence a été détectée quant à l'effet antiprolifératif de l'HGF sur les cellules HepG2. Cet effet a été confirmé dans les échantillons « contrôle » où l'HGF a directement été introduit dans le milieu à 20 ng/mL. 30% d'AM en moins ont été obtenus sur ces échantillons par rapport au contrôle sans HGF. La même tendance a été observée quelle que soit la méthode de stérilisation utilisée sur les lamelles. Les AM obtenues sur les filaments avec ou sans HGF1X sont cependant différentes en fonction de la méthode de stérilisation. Par rapport aux filaments PLGA, les filaments contenant la protéine ont par exemple un effet antiprolifératif après avoir été stérilisés aux antibiotiques ou aux UV, mais induisent un effet prolifératif lorsqu'ils ont été stérilisés à l'éthanol. Il est assez délicat d'interpréter ces résultats et d'expliquer de

telles tendances car les filaments semblent posséder les mêmes caractéristiques physico-chimiques et posséder des diamètres équivalents. En émettant l'hypothèse que l'HGF présent dans les filaments soit libéré dans le milieu de culture, il paraîtrait cohérent que les filaments contenant HGF1X induisent un effet anti-prolifératif par rapport aux filaments sans protéine. Les résultats obtenus sur les échantillons stérilisés par antibiotique ou UV semblent donc plus cohérents que ceux obtenus avec la stérilisation à l'éthanol. Les résultats obtenus après stérilisation UV sont, de plus, très encourageants car l'effet antiprolifératif des filaments contenant HGF est presque aussi marqué que dans le cas du contrôle.

Les trois méthodes de stérilisation n'induisant pas de modification notable des filaments et de leurs propriétés, il a été délicat d'en choisir une pour la suite de l'étude. Néanmoins, les résultats très prometteurs de prolifération obtenus sur les échantillons stérilisés aux UV ont permis de finaliser ce choix. La stérilisation aux UV a donc été choisie pour la suite de l'étude. En plus des très bons résultats de prolifération obtenus, cette méthode présente aussi l'avantage d'être rapide, facile à mettre en place, et permet d'éviter d'immerger les échantillons avant la culture cellulaire pour ne pas libérer prématurément une partie des protéines présentes à la surface des filaments.

#### 1.4 Etude biologique des structures produites

L'influence de l'HGF sur les cellules HepG2 a été étudiée par le suivi de la prolifération cellulaire et par l'étude d'expression génique et de marqueurs biochimiques des cultures cellulaires obtenues. Ces derniers tests consistent à détecter des molécules qui auraient été produites par la cellule en réponse à son interaction avec l'HGF.

#### 1.4.1 Prolifération des cellules HepG2

L'HGF a un effet antiprolifératif connu sur les cellules HepG2 [167], [169]. La variation de la prolifération en présence ou en absence d'HGF est donc une information importante pour savoir si la protéine a pu interagir avec les cellules. Les premiers tests de prolifération WST-8 réalisés dans le cadre de l'influence de la stérilisation avaient déjà confirmé qu'en présence d'HGF dans le milieu à 20 ng/mL, les cellules présentaient une AM plus faible de 30%. D'autres cultures cellulaires ont été réalisées afin de confirmer cette tendance. Deux cultures ont été réalisées sur des membranes monocouches et deux autres sur des membranes multicouches. Les diamètres des filaments de ces deux types d'échantillons sont présentés dans le Tableau 5-5 (images des filaments en Annexe 21 et Annexe 22). Les diamètres sont du même ordre de grandeur quelle que soit l'échantillon. Il existe néanmoins, une légère différence entre les échantillons de PLGA. Des filaments plus épais de 2,0 ±0,1 µm sont obtenus sur les membranes multicouches alors que des filaments  $1,6 \pm 0,1 \mu m$  sont obtenus sur les membranes monocouches. Cela est peut-être lié à l'utilisation d'une distance de travail plus faible dans le cas de la production des membranes plus épaisses, limitant ainsi l'étirage de filaments. Les filaments s'affinent ensuite au fur et à mesure que la teneur en HGF dans les filaments augmente. Dans le cas de la production des membranes multicouches, les conditions utilisées en électrofilage entre la solution de PLGA + HGF1X et 10X sont presque identiques (Tableau 5-3). La différence de diamètre n'est donc pas liée aux différences de conditions utilisées. L'hypothèse est, cette fois, confirmée : l'affinement des filaments est causé par la présence de la protéine en solution.

	PLGA	PLGA + HGF1X	PLGA + HGF10X	
Membrane	16+01um	09+01um	05+01um	
monocouche	1,0 ± 0,1 μm	0,5 ± 0,1 μΠ	0,5 ± 0,1 μπ	
Membrane multicouche	2,0 ± 0,1 μm	0,9 ± 0,1 μm	0,5 ± 0,2 μm	

Tableau 5-5 Moyenne des diamètres de filaments testés sur membrane monocouche et multicouche

Pour revenir sur les tests de prolifération, un article de 2007 [179] a montré que l'effet antiprolifératif de l'HGF n'est pas toujours observé et peut dépendre de la densité cellulaire présente au début de la culture. Il a été montré que l'effet antiprolifératif était visible lorsque l'HGF est en contact avec une densité cellulaire importante de 3.10<sup>4</sup> à 6.10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup>. A contrario, un effet prolifératif est observé lorsque la densité cellulaire est plus faible d'environ 1.10<sup>4</sup> à 2.10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup>. Afin de vérifier les informations présentes dans cet article et se trouver dans les conditions favorables à l'induction d'un effet antiprolifératif, deux densités cellulaires ont été testés. La première densité testée est de 2.10<sup>4</sup> cellules par cm<sup>2</sup>. Celle-ci correspond à une densité intermédiaire entre l'effet prolifératif et antiprolifératif observé dans l'article. La deuxième densité est de 8.10<sup>4</sup> cellules par cm<sup>2</sup>. Celle-ci correspond à une effet antiprolifératif devrait être obtenu.

Deux cultures cellulaires réalisées à partir de faible densité cellulaire ont été réalisées sur des membranes monocouches de filaments alors que deux autres avec les densités cellulaires plus importantes ont été réalisées sur les membranes multicouches. Les résultats des quatre tests de prolifération sont présentés en Figure 5-10.

Les résultats du premier essai (Figure 5-10-(a)) confirment ce qui avait précédemment été obtenu : l'HGF introduit dans le milieu et les filaments avec HGF1X ont, tous deux, un effet antiprolifératif de presque 30% par rapport aux échantillons « contrôle » (milieu sans HGF et filament sans HGF).

Sur le second essai (Figure 5-10-(b)), les échantillons « contrôle » avec présence d'HGF dans le milieu présentent cette fois un effet prolifératif par une augmentation de l'AM de 10%. Les variations de prolifération obtenues sur les filaments avec ou sans HGF sont, cependant, similaires au premier essai. Les filaments de PLGA + HGF1X induisent la perte d'AM de presque 20%. Les filaments contenant 10 fois plus d'HGF (PLGA + HGF10X), présentent des AM similaires au contrôle (filaments de PLGA) : celle-ci est légèrement plus importante de 5%.

Une tendance similaire a été obtenue sur les filaments de PLGA + HGF1X mais les résultats obtenus sur les échantillons « contrôle » où l'HGF a été introduit dans le milieu ne sont pas reproductibles. Ces résultats confirment alors peut-être que cette faible densité cellulaire ne permet pas d'obtenir des taux de prolifération reproductibles.

Cependant, la tendance n'est pas plus marquée à plus forte densité cellulaire (Figure 5-10-(c)(d)). A 8.10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup>, les échantillons « contrôle » présentent une légère différence d'AM. Une perte d'AM de 8% et 1% sont obtenus sur les deux cultures. Ces différences ne sont pas significatives car elles sont de l'ordre de la variabilité calculée à partir des duplicata, surtout dans le cas du deuxième essai (Figure 5-10-(d)). Concernant les échantillons avec filaments, un autre échantillon a été intégré dans les tests « PLGA + HGF(SOL) » : il s'agit de filaments de PLGA où l'HGF a été intégré dans le milieu à 20 ng/mL. Les résultats d'AM obtenus sur les différents filaments sont assez reproductibles sauf pour l'échantillon « PLGA + HGF(SOL) ». Pour le premier essai (Figure 5-10-(c)), 26% d'AM en moins est obtenu lorsque HGF est injecté dans le milieu en présence de filaments PLGA alors que pour le second test (Figure 5-10-(d)), les AM des échantillons PLGA avec et sans HGF dans le milieu sont similaires. De

manière similaire aux deux essais précédents sur membranes monocouches, entre 20 et 40% d'activité sont perdues en présence de filaments de PLGA HGF1X. Les résultats obtenus sur les filaments de PLGA HGF10X sont moins reproductibles car un effet antiprolifératif marqué est obtenu sur le dernier essai (Figure 5-10-(d)). Si les résultats d'AM sur les filaments de PLGA + HGF1X et 10X sont comparés, une tendance similaire peut être remarquée : les filaments de PLGA + HGF10X présentent un taux d'AM légèrement plus important que dans le cas du PLGA + HGF1X.



Figure 5-10 Résultats de la prolifération des HepG2 après 5 jours de culture réalisés par test WST-8 sur les filaments avec ou sans HGF et sur membranes monocouches et densité cellulaire initiale de 2.10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup> (a) (b) et multicouches et densité cellulaire initiale de 8.10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup> (c) (d).

Les résultats concernant les échantillons « contrôle » avec et sans HGF sont très surprenants au vu d'études antérieures montrant l'effet antiprolifératif de l'HGF sur les cellules HepG2 [167], [169], [180], [181]. Dans notre cas, aucun effet marqué ne différencie l'AM de ces deux échantillons. En approfondissant les recherches, une étude moins récente a été trouvée dans laquelle les auteurs montrent que la croissance des cellules HepG2 est stimulée 1,7 fois par la présence d'HGF à 20 ng/mL [182]. Après discussion, les auteurs émettent l'hypothèse d'une relation partielle entre cet effet prolifératif et une perturbation de la voie signalétique c-Met encourageant l'activation de la voie MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*). L'étude de 2007 [179] montrant l'effet de la densité cellulaire sur la prolifération des cellules HepG2 par HGF, aurait pu apporter une explication à ces résultats variables. Cependant, les résultats de cette étude ne semblent pas valider l'hypothèse. En parallèle de ces études montrant l'effet antiprolifératif d'HGF, un nombre important d'études a aussi montré la capacité d'HGF à promouvoir la mobilité des cellules HepG2 et leur caractère invasif [183]–[185]. Cela montre alors que l'HGF a un effet pouvant paraître complexe sur les cellules HepG2.

L'AM entre PLGA, PLGA + HGF1X et PLGA + HGF10X semble évoluer de la même manière, quel que soit le graphique considéré de la Figure 5-10. En effet, les filaments de PLGA + HGF1X présentent un taux d'AM plus faible que l'échantillon PLGA ne contenant pas d'HGF. L'AM des cellules présentes sur les filaments PLGA + HGF10X est plus importante que pour les filaments 10 fois moins concentrés (HGF1X) avec une AM se situant à un niveau intermédiaire ou égal à celui des filaments de PLGA pur. Une publication antérieure avait montré que le diamètre de filaments entre 1 µm et 300 nm de chitosan électrofilés pouvait avoir une influence sur l'expression génique de chondrocytes [186], de même qu'une autre étude sur des filaments de poly (caprolactone) (PCL) entre 4 µm et 400 nm de diamètre [187]. Les résultats avaient montré que les cellules proliféraient de manière plus importante sur les filaments micrométriques et qu'elles étaient capables de pénétrer au sein de la membrane contrairement à la membrane de filaments nanométriques. Cette relation semble néanmoins dépendante du type cellulaire puisqu'il a récemment été montré que la variation du diamètre des filaments de PLGA électrofilés dans du HFIP ne possède pas d'influence significative sur la prolifération de cellules de type HUVEC (Human umbilical vein endothelial cell). Elle possède uniquement une légère influence sur la vitesse de migration des cellules (de l'ordre de 20  $\mu$ m.h<sup>-1</sup>) [188]. Les résultats de notre étude sont les mêmes sur les échantillons monocouches et multicouches, bien que les cellules soient à la fois en contact avec la lamelle de Thermanox<sup>™</sup> et les filaments dans le premier cas, et uniquement en contact avec les filaments dans le second cas. Cela montre d'une part que les résultats de prolifération obtenus ne dépendent pas du taux de pénétration des cellules au sein des membranes et d'autre part qu'ils ne dépendent pas, non plus, de la quantité de filaments présents. Il est aussi possible d'affirmer que ces différences d'AM ne sont pas directement liées à la concentration en HGF dans le milieu, puisque la quantité d'HGF libérée devrait être plus importante pour les membranes multicouches. Ces résultats laissent donc supposer que les différences reproductibles de comportements obtenus découlent d'une interaction à l'interface entre filaments et cellules. A ce stade de caractérisation, il n'est pas possible d'affirmer que ces comportements sont liés à la géométrie (diamètres) des filaments ou la potentielle présence d'HGF libéré ou accessible à leur surface.

#### 1.4.2 Etude de l'activation du récepteur c-Met des HepG2 par HGF

Toujours dans le but de déterminer l'interaction qu'a pu avoir l'HGF introduit dans le milieu ou dans les filaments avec les cellules HepG2, la voie d'activation du récepteur c-Met des HepG2 par HGF a été étudiée. Cette étude consiste à marquer ou quantifier la réponse signalétique de la cellule provoquée par l'interaction avec l'HGF. La voie de signalisation que crée HGF lorsqu'il se fixe sur son récepteur spécifique c-Met est plutôt bien connu dans la littérature et fait l'objet de stratégies de traitement contre certains cancers [168]. L'HGF se fixe au récepteur transmembranaire c-Met qui va induire la phosphorylation de deux de ses acides aminés. Par la suite, tout un processus signalétique intracellulaire est engagé pour aboutir à l'expression de certains gènes spécifiques. Par exemple, le gène Id1 des cellules est sous-exprimé après interaction avec HGF, le gène P16 est au contraire surexprimé (Figure 5-3) [171]. D'autres gènes comme le gène Cycd1 qui est un marqueur caractéristique de la prolifération des cellules peuvent aussi être intéressant à analyser (Figure 5-3).

Afin de quantifier l'interaction de l'HGF avec les cellules, le récepteur c-Met phosphorylé a d'abord été analysé, puis un test PCR a été réalisé afin de quantifier les gènes d'intérêts.

> Détection du récepteur c-Met phosphorylé

Le récepteur c-Met phosphorylé (noté « c-Met-P ») a été analysé selon deux techniques : test western blot et immunomarquage. Le western blot est un test capable de séparer et détecter les récepteurs c-Met-P présents dans un échantillon. L'immunomarquage est une technique capable de marquer par un fluorophore spécifique ce même récepteur au sein des cellules. En combinant ce marquage par des observations au microscope confocal, il est ainsi possible de visualiser et localiser la présence du récepteur phosphorylé. Les résultats de ces deux tests sont présentés en Figure 5-11.



Figure 5-11 Résultats du marquage du c-Met-P en western blot et en immunomarquage sur des HepG2 après 5 jours de culture. Les résultats du western blot effectué sur le c-Met-P et l'albumine sont présentés dans la fenêtre du haut. Les images obtenues par microscopie confocale après l'immunomarquage de l'AFP (en vert), du c-Met-P (en rouge), et du noyau par DAPI (en bleu) sont présentées dans la fenêtre du bas.

Le test western blot (vignette du haut de la Figure 5-11) a été réalisé sur les échantillons provenant du dernier test WST-8 (Figure 5-10-(d)), par marquage du récepteur c-Met-P et par détection de l'albumine qui est une protéine témoin de la prolifération cellulaire. La présence de protéine est indiquée par une tâche noire. Plus la protéine est en grande quantité, plus la tâche devient sombre et épaisse. L'albumine est présente dans l'ensemble des conditions testées. La tâche correspondante paraît légèrement plus épaisse dans le cas des échantillons contenant les filaments, et particulièrement l'échantillon « PLGA ». Ces résultats confirmeraient les résultats obtenus sur le test WST-8 (Figure 5-10) qui montre une AM plus importante sur les échantillons avec filaments et surtout sur l'échantillon « PLGA ». Concernant le marquage du récepteur c-Met-P, il est possible de distinguer sa présence sur l'échantillon PLGA + HGF1X et, de manière plus prononcée, sur PLGA + HGF10X. Ces résultats sont donc intéressants puisqu'ils suggèrent que l'HGF des filaments a pu interagir avec les cellules HepG2. Les filaments HGF10X contenant plus d'HGF, induit la phosphorylation d'un plus grand nombre de récepteurs c-Met. Dans le cas de l'échantillon « contrôle » contenant de l'HGF dans son

milieu, la tâche est à peine visible. Dans ce cas, très peu de récepteurs c-Met ont été phosphorylés par l'interaction avec l'HGF. Ce résultat peut sembler étonnant compte tenu de la présence de HGF à une teneur de 20 ng/mL. Il suggère que la présence de la protéine dans les filaments permet la phosphorylation d'un plus grand nombre de récepteurs c-Met par rapport aux échantillons « contrôle ».

L'immunomarquage (vignette du bas de la Figure 5-11) a été réalisé sur des échantillons issus d'un des premiers tests WST-8 (Figure 5-10-(a)). Celui-ci a donc été réalisé sur des échantillons « contrôle » et contenant des filaments de PLGA sans HGF et avec HGF1X. Durant ce test, le récepteur c-Met-P a été marqué ainsi que la protéine AFP qui témoigne de l'AM des cellules. Concernant le marquage de l'AFP, il est possible d'observer une coloration sur tous les échantillons et une coloration à peine plus prononcée sur les échantillons « contrôle » et « PLGA ». Cela confirme les résultats d'AM obtenus avec le test WST-8 (Figure 5-10-(a)). Concernant ensuite le marquage du c-Met-P, il est possible d'observer la présence à peine visible de coloration pour les échantillons « contrôle » et « PLGA » alors qu'ils ne contiennent pas d'HGF. Cependant, les réglages étant les mêmes pour tous les échantillons, on peut en déduire que l'échantillon PLGA + HGF1X contient des récepteurs c-Met-P, alors que le contrôle avec HGF ne semble pas en contenir ou à peine. Cela confirme les résultats précédents indiquant une influence, même faible, de la présence d'HGF dans le milieu de culture. Ce phénomène est encore plus marqué lorsque la protéine est introduite dans les filaments.

#### > PCR

Une analyse PCR a été réalisée afin de quantifier l'expression de gènes spécifiques à l'interaction des HepG2 avec HGF. Les gènes Id1, P16, Cycd1 (Figure 5-3) et AFP (marqueur de l'activité métabolique) ont été ciblés. Le test a été réalisé sur les échantillons issus du dernier test WST-8 (Figure 5-10-(d)). Les résultats sont présentés en Figure 5-12.



Figure 5-12 Résultats du test PCR sur les différentes conditions testées

Le taux d'expression des gènes ciblés a été normalisé par rapport aux résultats obtenus sur l'échantillon « contrôle » qui correspond donc au taux égal à 1 sur le graphique. L'échantillon « contrôle + HGF » où l'HGF a été introduit dans le milieu, ne présente pas de différence d'expression génique significative par rapport au contrôle. Effectivement, la variabilité obtenue sur les valeurs est aussi importante que la moyenne. Seul le gène CycD1 est surexprimé de manière significative par rapport au contrôle. Ces résultats ne permettent pas de justifier l'interaction de l'HGF, présent dans le milieu de culture, avec les HepG2 car le CycD1 aurait dû être sous-exprimé en présence d'HGF comme cela est le cas pour les filaments contenant la protéine. Une fois de plus, l'interaction de l'HGF de

l'échantillon « contrôle » n'a pas été clairement démontrée, mais elle l'a été pour les échantillons électrofilés avec du facteur de croissance. De la même manière, l'interaction avec HGF permet de diminuer l'expression du gène Id1 pour les filaments contenant HGF par rapport aux filaments qui n'en contiennent pas. L'expression du gène AFP étant témoin de l'AM des cellules, ces résultats concordent avec les résultats des tests WST-8 (Figure 5-10-(d)) : L'AM diminue en présence de filament avec HGF1X et HGF10X par rapport aux filaments PLGA. Un résultat paraît cependant contradictoire par rapport à la littérature : l'expression du gène P16 a diminué pour les filaments contenant de l'HGF alors qu'il aurait dû être surexprimé par interaction avec HGF puisqu'il est attendu que ce soit l'expression du gène p16 qui bloque celui de CycD1.

L'étude de la voie d'activation du récepteur c-Met apportent des informations souvent contradictoires. Plusieurs facteurs comme la détection du récepteur phosphorylé de l'HGF par western blot et l'immunomarquage ou la sous-expression des gènes Id1 et CycD1 ont tendance à montrer que les cellules en contact avec les filaments contenant la protéine ont interagit avec l'HGF. Néanmoins, ces résultats sont discutables car la présence de c-Met-P ou des gènes découlant de l'activation du récepteur n'a pas été démontré lorsque HGF est présent dans le milieu à 20 ng/mL.

#### 1.4.3 Détection de l'HGF libéré ou au sein des filaments de PLGA

Afin de vérifier d'une autre façon que la protéine est libérée des filaments et est capable d'interagir avec les cellules, d'autres tests ont été réalisés avec un kit ELISA. Ce kit ELISA est capable de détecter et quantifier l'HGF grâce à une réaction anticorps-antigène. Les résultats obtenus à partir de ce test donnent donc une information sur la concentration de l'HGF mais aussi sur sa configuration spatiale qui permet la réaction anticorps-antigène. Si la structure de l'HGF est modifiée, la protéine aura moins de chance d'être détectée par son anticorps et donc par le test ELISA. En complément des tests de libération, des tests ont été mis en place pour vérifier l'influence de la présence du solvant HFIP.

> Influence du solvant sur la détection de l'HGF par ELISA

Une solution d'HGF a d'abord été préparée dans l'eau à 5 ng/mL. Cette solution a ensuite été divisée en deux : dans une partie de la solution, 10% de solvant HFIP (HGF + 10% HFIP) a été ajouté alors que dans l'autre partie, 1% d'HFIP a été ajouté (HGF + 1% HFIP).

Une autre solution d'HGF, cette fois dans l'HFIP, a été préparée à 500 ng/mL. Cette solution a ensuite été divisée en deux : une partie de la solution a été diluée 100 fois avec de l'eau et une autre partie a été diluée 10 fois. Des solutions contenant alors 1 (HGF + 1% HFIP) et 10% d'HFIP (HGF + 10% HFIP) ont été obtenues.

Les résultats du dosage de l'HGF par ELISA en fonction de la teneur en solvant sont présentés en Figure 5-13. Le pourcentage d'HGF a été calculé par rapport à la concentration détectée par l'ELISA et celle connue en HGF.

En présence de 10% d'HFIP, entre 17 et 23% d'HGF sont détectés alors qu'avec 1% de solvant, la totalité de l'HGF initialement introduite en solution est détectée avec des valeurs pouvant dépassées 100%. Il est surprenant de détecter une quantité plus importante de protéine par rapport à la concentration initiale mais cela peut être relié au fait qu'il s'agit de deux lots différents de protéine. La gamme d'étalonnage de l'ELISA et la protéine introduite dans l'eau puis avec du solvant (« Dilution d'HGF dans HFIP ») proviennent du même lot alors que la protéine introduite directement dans l'HFIP (« Dilution d'HGF dans l'eau ») provient d'un autre. Effectivement, l'HGF étant conditionné en petite quantité lyophilisée (ordre du mg), le même lot ne peut pas être divisé par pesée pour être dissout soit dans l'eau ou l'HFIP. Ces résultats témoignent donc des différences que l'on peut trouver sur l'activité de
l'HGF de même référence mais de lots différents. L'échantillon qui présente plus de 100% d'HGF laisse donc supposer que la totalité de la protéine a été détectée. Ces résultats indiquent donc que la teneur en HFIP ne doit pas être supérieure à 1% pour que la protéine puisse être détectée. Ces indications ont permis de conditionner les tests qui suivent.



Figure 5-13 Résultats du dosage de l'HGF par ELISA en fonction de la proportion en HFIP dans le milieu (1% ou 10%).

### Détection de l'HGF dans les filaments

La détection d'HGF présent dans les filaments par ELISA a été réalisée suivant deux stratégies. La première a été de dissoudre une membrane de filaments de PLGA HGF10X dans de l'HFIP puis diluer une partie de la solution dans l'eau pour n'obtenir qu'1% d'HFIP (teneur limite à partir de laquelle, l'HGF peut être détecté). La solution devrait contenir 5 ng/mL d'HGF. La seconde stratégie a été de détecter l'HGF libéré des filaments dans du milieu de culture après 10 min, 1 heure, 24 heures et 1 semaine d'incubation à 37°C. Les résultats de l'ELISA sont présentés dans le Tableau 5-6. Pour ce dernier test, des membranes de 10 mg de PLGA + HGF10X (« PLGA + HGF10X M2 », Tableau 5-3) contenant environ 56 ng d'HGF ont été utilisées.

Tableau 5-6 Résultats du test ELISA: concentration d'HGF mesurée après dissolution des filaments ou après libération dans du milieu de culture ; les valeurs sont exprimées en pourcentage

	Dissolution PLGA HGF 10X (5ng/mL)	HGF libéré 10 min	HGF libéré 1 heure	HGF libéré 24 heures	HGF libéré 1 semaine
Absorbance moyenne	-0,02	-0,01	-0,01	0,00	-0,01
Concentration HGF mesurée (ng/mL)	-0,09	-0,05	-0,05	-0,03	-0,02

Le calcul des concentrations de l'ELISA a été effectué à partir d'une droite d'étalonnage réalisée sur une gamme de concentration de 8 à 0,125 ng/mL d'HGF. Ces résultats montrent que pour l'ensemble des conditions testées, l'HGF n'a pas pu être détecté. Ces résultats pourraient être expliqués par différentes hypothèses :

- Il est d'abord possible que l'HGF ait été dénaturé par le procédé d'électrofilage ce qui rend impossible sa détection par ELISA.

- Concernant la dissolution des filaments de PLGA, il est aussi possible que la protéine soit restée piégée dans le polymère qui précipite lors du changement de solvant, de l'HFIP vers l'eau.

- D'autre part, la cinétique de libération est peut-être trop faible pour détecter la protéine dans le milieu. La limite de détection du kit ELISA est de l'ordre de 0,04 ng/mL et la limite de la gamme de linéarité est de 0,125 ng/mL. La masse d'HGF dans les membranes étant de 56 ng, cela indique donc qu'après 1 semaine d'incubation, moins de 0,04% d'HGF n'a été libéré des filaments dans 0,5 mL de milieu de culture, ce qui est très faible.

### 1.5 Conclusion

Cette partie de thèse s'est consacrée à l'étude de l'effet induit par HGF au sein de filaments de PLGA sur des cellules cancéreuses HepG2. En première partie, une étude de la cytotoxicité des filaments et de l'influence de trois stérilisations a d'abord été menée. Au vu de la biocompatibilité reconnue du PLGA, il a été surprenant d'observer une quantité non négligeable de cellules mortes sur la surface de filaments de PLGA. Cette tendance a été reliée au manque d'adhésion cellulaire puisqu'après dépôt de collagène sur les filaments, plus aucun effet cytotoxique n'a été induit. Les stérilisations par bain d'éthanol, solutions d'antibiotiques ou aux UV n'ont eu aucune influence visible sur les propriétés ou la morphologie des filaments mais quelques différences ont été observées sur l'AM des HepG2 après 5 jours de culture. Ces différences n'ont pas été expliquées mais l'effet anti-prolifératif attendu de l'HGF sur les cellules a été particulièrement marqué sur les échantillons stérilisés aux UV. La stérilisation aux UV ayant aussi l'avantage d'éviter des lavages en milieu aqueux qui peuvent éliminer une partie de l'HGF présent à la surface des filaments, ce sont donc les raisons pour lesquelles **la stérilisation UV a été utilisée pour la suite de l'étude. Un dépôt de collagène a aussi été réalisé avant chaque culture cellulaire.** 

L'étude biologique de l'HGF a été réalisée en deux temps par l'étude de la prolifération des cellules à partir de leur AM puis par l'étude de la voie d'activation du récepteur c-Met. Deux tests WST-8 ont quantifié l'AM des HepG2 à partir de densité cellulaire faible (2.10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup>) sur des membranes monocouches et deux autres à partir de densité cellulaire plus élevée (8.10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup>) sur des membranes multicouches. Des tendances similaires ont été trouvées pour ces deux doublets d'essais. L'AM des cellules après 5 jours n'est significativement pas différente avec ou sans présence d'HGF dans le milieu de culture à 20 ng/mL, ce qui est très surprenant par rapport à la littérature. L'AM des cellules en contact avec les filaments contenant HGF1X est généralement plus faible que l'AM de l'échantillon de filaments PLGA. De plus, l'AM des cellules sur les filaments PLGA + HGF1X) pour atteindre des taux presque similaire à ceux obtenus sur les échantillons PLGA.

L'étude s'est poursuivie par l'étude de la voie d'activation du récepteur spécifique de l'HGF, c-Met, par western blot, immunomarquage et PCR. Concernant les échantillons « contrôle » sans filaments, le test western blot et le test PCR ont montré l'absence de récepteur c-Met activé (phosphorylé) et aucune réponse signalétique concordant avec la littérature avec ou sans HGF à 20 ng/mL dans le milieu. L'immunomarquage du récepteur phosphorylé a indiqué une présence légèrement plus importante de c-Met-P lorsque HGF est introduit dans le milieu. **Ces résultats semblent donc montrer que l'HGF n'a que très peu interagit avec son récepteur c-Met.** Les résultats obtenus sur les filaments de PLGA, PLGA + HGF1X et PLGA + HGF10X ont montré des tendances contraires. **Le récepteur c-Met phosphorylé a été détecté sur les filaments contenant 1X d'HGF et davantage sur les filaments 10 fois plus concentrés, HGF10X. L'expression génique des cellules est cohérente avec les résultats de western blot et immunomarquage puisque l'AFP, l'Id1 et le CycD1 ont été sous-exprimé en présence de filaments HGF. Toutefois, le gène P16 qui aurait dû être sur-exprimé, ne l'a pas été ce qui** 

pourrait s'expliquer par le fait que dans notre étude, les cellules ont été cultivées sur des filaments contrairement à l'étude citée.

Alors que les résultats laissent supposer que les cellules ont interagit avec HGF présent dans les filaments, le contraire a été remarqué sur les échantillons « contrôle ». La diversité des études présentes dans la littérature sur les différents effets que peut induire HGF sur les cellules HepG2 montrent que la caractérisation de ces effets doit être choisie judicieusement. L'AM des cellules est souvent représentative par défaut à la prolifération cellulaire néanmoins, l'ensemble des études montrant l'effet antiprolifératif de l'HGF se sont basées sur des résultats de nombres de cellules par hémocytométrie. Dans notre cas, un comptage cellulaire n'a pu être utilisé comme méthode de caractérisation car la présence de filaments ne permet pas le comptage direct des cellules au microscope optique et car le comptage des cellules après détachement n'a pas été possible. En effet, après plusieurs tests, le détachement des cellules des filaments s'est révélé partiel et non reproductible. La seule étude s'étant basée sur l'AM des HepG2, comme dans notre cas, a montré au contraire, un effet prolifératif de l'HGF [182]. Dans leur cas, les cellules ont été ensemencées à une densité de 5000 cellules/puit (plaque de 96 puits) avec une concentration de 20 ng/mL en HGF et l'analyse de l'AM a été réalisée trois jours après. L'AM n'est pas la méthode de caractérisation de choix pour vérifier l'effet antiprolifératif des HepG2. Cependant, cela n'explique pas pourquoi l'interaction de l'HGF n'a pas été mise en évidence par l'étude de l'activation du récepteur c-Met. Les études sont toutes unanimes sur ce point : l'HGF induit la phosphorylation du récepteur, la surexpression du gène p16 ainsi que la sous-expression des gènes Id1 et CycD1. Cela prouve donc l'absence d'interaction HGF/c-Met sur les échantillons « contrôle ». La densité cellulaire faible et élevée n'a montré aucune différence sur les résultats, ce qui laisse supposer qu'elle ne peut pas en être la cause. L'influence de la concentration en HGF sur les cellules n'a cependant pas été étudiée ici. Une concentration de 50 ng/mL est généralement utilisée dans les études démontrant l'effet antiprolifératif d'HGF, ce qui est supérieur à celle utilisée dans notre cas (20 ng/mL). Le fait d'utiliser une concentration en HGF trop faible pour obtenir l'interaction HGF/c-Met semble peu probable car une étude antérieure avait montré la présence d'un effet antiprolifératif marqué des HepG2 à partir de 5 ng/mL d'HGF après 4 jours de culture [180]. Il est aussi important de remarquer la présence de collagène type I dans cette étude, ce qui n'est pas le cas des études citées. Le collagène pourrait peut-être perturber l'activité de la protéine ou de son récepteur cellulaire. Une étude antérieure a montré qu'effectivement, l'HGF peut se fixer au collagène de type I [189] mais que cette liaison ne perturbait pas l'activité de la protéine. Le comportement de cellules hépatocytes primaires était similaire en présence d'HGF avec ou sans collagène. L'étude citée met, cependant, en évidence le fait qu'HGF peut se fixer sur le film de collagène et donc causer une augmentation locale de la concentration en HGF. En fonction de la dose accessible par les cellules sur le film, leur comportement pourrait être modifié. Une dernière hypothèse serait sinon la perte d'activité du lot d'HGF utilisé pour les échantillons « contrôle » au Japon (un lot différent a été utilisé pour produire les filaments de PLGA avec HGF en France).

Des résultats cohérents ont été obtenus entre tests de prolifération et l'étude de l'activation du récepteur c-Met sur les échantillons de PLGA, PLGA + HGF1X et PLGA + HGF10X. Ils semblent supposer que les cellules HepG2 ont pu interagir avec HGF présent dans les filaments. Pourtant, même après 1 semaine d'incubation à 37°C, la protéine n'a pas été détectée dans le milieu par ELISA, supposant ainsi que la protéine est dénaturée ou très peu libéré (< 0,04%). **Ces résultats confirment donc que le comportement des cellules sur les filaments n'est pas lié à la différence de concentration de l'HGF dans le milieu.** Nous aurions tendance à suggérer que ce comportement est causé par une interaction à l'interface filament-cellule. Il a déjà été démontré que des protéines fixées au sein d'un film de polymère étaient capable d'interagir avec les cellules présentes à leur surface [190]. **Nous pourrions** 

alors émettre l'hypothèse que même si l'HGF n'est que très peu libéré des filaments, il est tout de même capable d'interagir avec les cellules HepG2. Cette hypothèse pourrait alors expliquer les résultats (western blot, immunomarquage, PCR) obtenus sur les différents filaments. D'autre part, des études antérieures ont montré que le comportement cellulaire comme leur prolifération pouvait être influencé par le diamètre de filaments électrofilés [186], [187]. La différence de comportements observée sur les échantillons pourrait donc aussi être expliquée par la différence de diamètres des filaments. Cette hypothèse irait alors dans le sens des résultats obtenus sur les échantillons « contrôle » montrant l'absence d'interaction entre les cellules et HGF.

A ce stade de l'étude, il n'est pas possible d'affirmer ou infirmer une des deux hypothèses avancées. Il faudrait, pour cela, renouveler les tests par exemple sur des filaments PLGA de différents diamètres sans protéine. Si le comportement des HepG2 n'est pas influencé par le diamètre alors cela montrerait que les résultats obtenus dans cette étude sont liées à la présence d'HGF. Cela ouvrirait alors la possibilité de développer des dispositifs implantables capable de stimuler la régénération hépatique.

# 2. Etude biologiques de structures électrofilées pour la régénération parodontale

### 2.1 Contexte et objectifs

Cette étude s'inscrit dans un projet ayant pour but d'élaborer une structure à gradient de propriétés capable de régénérer les différents tissus du parodonte détruits lors d'une parodontite.

> La parodontite

La parodontite est une maladie multifactorielle (facteurs génétiques et environnementaux) d'origine infectieuse provoquant l'inflammation des tissus du parodonte jusqu'à leur destruction. Les tissus du parodonte correspondent aux tissus qui entourent et maintiennent la dent. Une parodontite aiguë provoque donc à terme le déchaussement des dents. En France dans les années 2002-2003, jusqu'à 50% de personnes adultes étaient atteintes de problème de déchaussement de leur dent lié à une parodontite en France [191]. Il s'agit donc d'une pathologie répandue et pour laquelle peu de moyens efficaces existent pour guérir et régénérer les tissus détruits.

Initialement, une dent est maintenue dans une cavité d'os alvéolaire par l'intermédiaire de ligaments parodontaux. Ces ligaments forment un tissu conjonctif situé à l'interface entre le tissu minéral de l'os alvéolaire et le tissu minéral du cément qui recouvre la racine de la dent (Figure 5-14).



Figure 5-14 Schéma de la composition et de l'organisation des tissus présents autour de la dent dans le cas d'un état de santé et dans le cas de la parodontite [192].

Dans le cas d'une parodontite, les deux tissus minéralisés (os alvéolaire et cément) et les deux tissus non minéralisés (ligament alvéolodentaire et gencive) sont directement affectés par la maladie. Afin de la limiter et éviter le déchaussement des dents, il est nécessaire d'éliminer d'abord l'envahissement bactérien mais surtout régénérer l'ensemble de ces quatre tissus qui permettent le maintien de la dent. La gencive est un tissu qui se régénère assez rapidement et recouvre d'ailleurs souvent les cavités issues de la perte de l'os et des ligaments parodontaux. Le défi réside donc dans la régénération de l'os et de l'interface que forment les ligaments entre l'os et le cément.

### > Stratégie de régénération du parodonte

Seulement un biomatériau est, à ce jour, sur le marché pour régénérer les tissus parodontaux. Il s'agit de l'Embogain® qui est un gel intégrant des protéines à appliquer dans la cavité formée après la destruction des tissus. L'utilisation de ce matériau permet de réduire la cavité mais sa consistance en forme de gel ne permet souvent pas de combler les cavités profondes et donc de restaurer tous les tissus détruits [193]. Une étude récente a démontré la capacité d'un matériau composé de trois couches d'hydrogel poreux pour régénérer les différents tissus du parodonte [194]. Une première couche contenant de la chitine, du PLGA, des nanoparticules de verres bioactifs et des protéines CEMP1 (cementum protein 1) régénère le cément. Une seconde couche composée de chitine, de PLGA et de protéines FGF2 (fibroblast growth factor 2) régénère la couche de ligaments parodontaux. Enfin, la dernière couche régénère l'os alvéolaire. Elle est composée de chitine, de PLGA, de nanoparticules de verres bioactifs et du plasma riche en plaquette (PRP, platelet rich plasma) contenant des protéines PDGF (platelet derived growth factor). L'utilisation de structures à gradient de propriétés est effectivement une des stratégies les plus prometteuses pour régénérer et organiser plusieurs tissus à la fois. L'utilisation de facteurs de croissance qui sont capables de stimuler spécifiquement une activité cellulaire comme la prolifération ou la différentiation est aussi très pertinente. Dans le cadre de cette thèse, l'approche abordée est similaire à l'étude de 2017 pour laquelle des résultats intéressants ont été obtenus in vivo. La structure ciblée possède un gradient de propriétés et intègre des facteurs de croissances capables de stimuler la régénération du parodonte. L'originalité du projet provient de l'utilisation de structures produites par électro-impression avec laquelle il est possible de finement optimiser et guider la régénération. L'avantage majeur de l'électro-impression est aussi sa capacité de produire des structures complexes en une seule impression. Cela représente un potentiel certain dans le cas où la production devrait être industrialisée.

Ce projet a été imaginé grâce à la collaboration avec deux odontologistes praticiens du LMI : M. Jean-Christophe Maurin et Mme. Kerstin Gritsch. Dans le cadre de ce projet ANR financé à partir de novembre 2016, plusieurs facteurs de croissance ont été ciblés, comme le CEMP1 ou le TGFβ. Le TGFβ a une action sur la croissance de plusieurs types cellulaires. Le CEMP1 a une action intéressante pour la régénération parodontale comme notamment la différentiation des cellules du ligament parodontal en cémentoblates [195]. Des nanoparticules d'hydroxyapatite (NPs d'HAP) ont aussi été sélectionnées pour leur capacité d'ostéoconduction<sup>8</sup> et de différentiation des cellules du ligament parodontal [196]. La structure imaginée initialement présente un gradient de composition permettant d'induire un gradient de vitesse de dégradation (Figure 5-15- structure de gauche). Trois polymères ont été ciblés pour induire ce gradient: le polycaprolactone (PCL), le copolymère PLGA avec 85% de monomère d'acide lactique et le copolymère PLGA avec 75% de monomère d'acide lactique. L'objectif de cette structure est de guider la croissance cellulaire du bas vers le haut, les deux parties étant constituées de polymère dont l'un se résorbe rapidement et l'autre se résorbe plus lentement. Un troisième polymère, caractérisé par un taux de dégradation encore plus lent, est prévu pour maintenir une tenue mécanique suffisante sur la durée de la régénération tissulaire (rôle de « charpente »).

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> L'ostéoconduction est un phénomène permettant au lit osseux de s'étendre vers une zone à régénérer (l'ostéogenèse).



Figure 5-15 Stratégie ciblée dans le projet ANR WEPRINT (2016) (structure de gauche) et dans cette thèse (structure de droite) pour la régénération parodontale.

La production de cette structure est un vrai défi car cela implique l'optimisation des conditions de dépôt localisé de trois polymères différents contenant (ou non) des protéines ou des NPs d'HAP. Dans le Chapitre 3 ont été exposées les conditions de dépôt localisé pour des solutions de PCL et de PLGA 85%. Il s'agit des conditions optimales pour la solution de PCL. Néanmoins le filage de la solution de PLGA n'était pas stable dans le temps. De plus, des essais préliminaires ont montré que l'ajout de protéines en solutions (en électrofilage conventionnel et coaxial) amplifiait ces instabilités. Ainsi, seules les solutions de PCL qui sont très stables sous champ électrique ont été électrofilées en présence de protéines.

> Stratégie visée dans le cadre de la thèse

A partir de ces constatations, des choix ont été faits pour s'adapter aux résultats obtenus tout en gardant comme objectif principal l'idée de parvenir à fabriquer un matériau résorbable à gradient de propriétés. La structure finalement visée diffère légèrement de celle établie dans le projet ANR, avec une configuration en deux couches parallèles (Figure 5-15- structure de droite). Le gradient sera ainsi créé en fonction des différents tissus à régénérer. D'un côté, la régénération de l'os alvéolaire est stimulée par une structure de PCL composite intégrant des NPs d'HAP [196], [197]. D'un autre côté, la régénération du cément est stimulée par une structure de PCL intégrant des protéines CEMP1 [198].

### 2.2 Matériels et méthodes

### 2.2.1 Composés

Le polycaprolactone (PCL) de grade médical a été acheté chez CORBION. La viscosité inhérente indiquée par le fournisseur est de 1,2 dl/g et sa masse molaire moyenne en poids déterminée par chromatographie d'exclusion stérique est de 160 kDa. Le solvant organique 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) utilisé pour dissoudre le PCL a été acheté chez TCI. Le polyéthylène glycol (PEG) de 35 kDa a été acheté chez Sigma Aldrich. Le PEG a été dissous dans de l'eau pure de conductivité 18,2 MΩ.cm.

Les NPs d'HAP ont été achetées en voie sèche chez Sigma Aldrich. La taille des particules indiquée par le fournisseur est inférieure à 200 nm. La protéine recombinante humaine CEMP1 (*cementoblastoma-derived protein 1*) a été achetée chez CUSABIO et a été produite par l'intermédiaire de levure. La protéine est fournie dans une solution tampon composée de 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl (pH 8,0) et 10% de glycérol.

Pour la culture cellulaire, des lamelles stériles en plastique Thermanox<sup>™</sup> de 13 mm de diamètre ont été achetées chez Dominique Dutscher et des plaques de 24 puits de culture cellulaire ont été utilisées (Fisher Scientific). Lorsque des membranes épaisses de filaments ont été testées en culture cellulaire, des joints en PTFE de 15 mm de diamètre (France Joint) ont été introduit dans les puits afin de fixer la membrane au fond.

### 2.2.2 Solutions et électrofilage/électro-impression

### Structure contenant des nanoparticules d'hydroxyapatite

Des solutions de PCL ont été préparées avec et sans NPs d'hydroxyapatite. Deux pourcentages massiques de NPs d'HAP par rapport au polymère ont été utilisés : environ 10 et 30%. Des teneurs plus importantes n'ont pas pu être testées car au-delà de 30%, les NPs ne se dispersent plus de manière homogène dans la solution. Ces solutions ont été préparées en deux étapes. Les solutions de polymères et les solutions de NPs dispersées dans l'HFIP ont été préparées et homogénéisées séparément. La solution de polymère a été agitée une nuit et la dispersion des NPs a été agitée 1 heure puis mise aux ultrasons pendant 1 autre heure. La dispersion de NPs est ensuite ajoutée à la solution de polymère. La solution est alors trop visqueuse pour être placée sur un agitateur magnétique. Elle est donc agitée manuellement à l'aide d'une spatule pendant 2-3 minutes, puis la solution est passée aux ultra-sons pendant 30 min. Les deux dernières étapes sont renouvelées à chaque fois que les solutions contenant les NPs doivent être utilisées. Ces solutions sont effectivement assez difficiles à homogénéiser. Pour la solution contenant 30% de NPs par exemple, un dépôt d'hydroxyapatite apparaît au fond du flacon après quelques heures de stockage.

Les concentrations utilisées pour préparer ces solutions sont indiquées dans le Tableau 5-7. La concentration du PCL a été fixée à 0,35 g/mL dans chaque solution. Il s'agit, en effet, de la concentration pour laquelle les conditions de dépôt localisé ont été optimisées (Chapitre 3).

	PCL	PCL+HAP10	PCL+HAP30	
Concentration PCL (g/mL)	0,35	0,35	0,35	
Concentration HAP (g/mL)	-	0,03	0,14	
Teneur massique HAP (%)	-	9	29	
	Electrofilage			
Débit (mL/h)	0,5	0,5	0,5	
Distance de travail (cm)	15	17,5	20,5	
Tension (kV)	6,75	6,57	6,57	
	Electro-impression			
Débit (mL/h)	0,02	0,02	0,02	
Distance de travail (mm)	3	3	3	
Tension (kV)	2,1	2,1	2,1	
Vitesse de déplacement (cm/s)	20	20	20	

Tableau 5-7 Composition des solutions d'HFIP utilisées, et paramètres d'électrofilage et d'électro-impression pour produire les structures contenant les nanoparticules d'hydroxyapatite.

Les trois solutions ont été utilisées pour produire des filaments de type « mat » en électrofilage conventionnel et des structures en forme de grille en électro-impression. Les conditions utilisées en électrofilage conventionnel sont indiquées dans le Tableau 5-7. Le débit de la solution a été fixé 0,5 mL/h et la tension optimale est d'environ 6,6 kV pour chaque solution. La distance de travail a dû être adaptée car, contrairement aux solutions de PCL, les solutions contenant les NPs présentaient un jet rectiligne jusqu'à la cible pour une distance de travail de 15 cm. Il semblerait que l'apport de NPs d'HAP en solution ait tendance à augmenter la stabilité du jet en électrofilage. L'augmentation de la viscosité de la solution par l'apport de NPs est sûrement en lien avec ce phénomène. Afin d'obtenir, un jet avec lasso et donc un mat de filaments déposés aléatoirement, la distance de travail a été augmentée à 17,5 et 20,5 cm pour les solutions à 10 et à 30% en HAP respectivement. Avec ces conditions, des membranes de 3-4 cm de diamètre ont été obtenues après un dépôt entre 6 et 7 min. L'aiguille utilisée pour ces essais d'électrofilage est une aiguille de 120 mm de longueur et de 0,5 mm de diamètre interne (21G).

Les conditions utilisées en électro-impression correspondent aux conditions optimisées dans le Chapitre 3 pour produire des structures organisées. Celles-ci sont exposées dans le Tableau 5-7. Les mêmes paramètres ont été utilisés pour chaque solution : le débit est de 0,02 mL/h, la tension de 2,1 kV, la distance de travail de 3 mm et la vitesse de déplacement du collecteur de 20 cm/s. L'aiguille utilisée est une aiguille de 22 mm de long et 0,5 mm de diamètre interne (21G). Le motif de la structure produite correspond à une grille dont les pores carrés sont larges de 200  $\mu$ m. La grille est formée de 20 couches de 60 lignes parallèles (espacées de 200  $\mu$ m) et de 4 cm de long. Les structures sont déposées individuellement sur un wafer de silicium. Le choix du wafer est lié à la facilité de manipuler ce type de substrat conducteur rigide, de dimensions adaptées pour les essais (environ 0,1 mm d'épaisseur et diamètre de 2 pouces).

### Structure contenant du CEMP1

A partir de l'étude menée au Chapitre 4, le CEMP1 a été encapsulé en l'intégrant au cœur des filaments produits par une aiguille coaxiale. Le CEMP1 a été intégré au cœur de filaments de PCL dans une solution aqueuse de PEG. Des solutions de PCL et des solutions aqueuses de PEG contenant ou non la protéine ont alors été préparées. Les diamètres internes des deux aiguilles qui la composent sont de 0,178 mm pour l'aiguille de cœur et de 0,508 mm pour l'aiguille de la coquille. La solution de PCL et de PEG sans protéine ont été préparées la veille de la mise en forme et agitées toute la nuit. La solution de PEG contenant le CEMP1 a été préparée le jour même afin de conserver la protéine stockée à -20°C le plus longtemps possible. La solution a été homogénéisée sous agitation pendant 30 min. La concentration de la solution de PCL dans l'HFIP est de 0,35 g/mL alors que les solutions de PEG sont de 0,3 g/mL. Cette concentration de PEG a été optimisée en se basant sur des informations tirées de la littérature portant sur la production de filaments cœur-coquille [199], [200]. Il ressort notamment des articles concernés, l'intérêt d'utiliser des solutions de cœur et de coquille de viscosité suffisamment proche pour obtenir des filaments homogènes. La viscosité de la solution de PCL étant très élevée, la concentration de PEG initialement utilisée à 0,1 g/mL (Chapitre 4) a été augmentée à 0,3 g/mL. La viscosité de la solution de PCL est de 17,2 Pa.s. Selon le graphique reliant la viscosité des solutions aqueuses de PEO à leur concentration (Chapitre 2, Figure 2-11, page 48), la solution de PEG à 0,3 g/mL aurait une viscosité d'environ 0,17 Pa.s. Le rapport des deux viscosités serait de 0,01, au lieu de 0,001 avec la concentration du PEG à 0,1 g/mL. La différence entre ces viscosités reste assez importante mais la concentration en PEG n'a pas pu être davantage augmentée car l'extrusion devenait difficile au sein de la fine aiguille du cœur. La concentration de la protéine dans la solution de PEG est de 2 mg/mL. Cette concentration correspond à la concentration de la solution délivrée par le fournisseur. Afin de maximiser la teneur en protéine dans les structures, la solution de protéine n'a pas été diluée. Le PEG a donc été directement introduit dans la solution de protéine. La protéine est stockée dans un tampon contenant 20 mM Tris-HCl, 0,5M NaCl et 10% de glycérol. Selon le fournisseur, ce tampon permet à la protéine de la maintenir stable en solution.

	Solution de la coquille Solution de cœur			
	PCL	PEG	PEG + CEMP1	
Concentration PCL (g/mL)	0,35	-	-	
Concentration PEG (g/mL)	-	0,3	0,3	
Concentration CEMP1 (mg/mL)	-	-	2	
Solvant	HFIP	Eau pure	Tampon CEMP1	
	Electro-impression			
Débit (mL/h)	0,02	0,005	0,005	
Distance de travail (mm)	3	3	3	
Tension (kV)	1,97	1,97	1,97	
Vitesse de déplacement (cm/s)	25	25	25	

Tableau 5-8 Composition des solutions utilisées et paramètres d'électro-impression pour produire les structures contenant le CEMP1. Les concentrations sont calculées à partir de la masse du produit sur le volume de solvant introduit.

Deux types de filaments cœur-coquille ont été produits : des filaments avec une coquille de PCL et un cœur de PEG qui contient ou non le CEMP1. Les conditions utilisées en électro-impression pour produire les structures organisées sont exposées dans le Tableau 5-8. Le débit de la solution de PCL est de 0,02 mL/h et le débit des solutions de PEG est de 0,005 mL/h. Le rapport entre les débits est de 0,25 tout comme le rapport de débit utilisé dans le Chapitre 4. La tension optimale utilisée a été de 1,97 kV et la distance de travail est de 3 mm. La vitesse de déplacement du collecteur a été fixée à 25 cm/s afin d'obtenir des filaments rectilignes. Le motif de la structure produite correspond à une grille dont les pores carrés possèdent un côté de 200  $\mu$ m. La grille est formée de 30 couches et de 70 lignes parallèles de 4 cm de long. La dimension de la structure a été augmentée par rapport aux structures contenant l'HAP qui possèdent 20 couches et 60 lignes. Le but est d'encapsuler une quantité de protéine plus importante. En fonction des teneurs en protéines présentes en solution (Annexe 23), du débit utilisé (0,005 mL/h) et du temps de dépôt d'une structure (23 min), la quantité de CEMP1 dans chaque structure a été estimée à 3  $\mu$ g.

Les structures sont déposées individuellement sur un wafer de silicium de 2 pouces de diamètre.

- 2.2.3 Caractérisation des filaments
- Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les observations par microscopie électronique à balayage ont été réalisées sur un microscope Merlin Compact (Zeiss) disponible sur la plateforme technologique CTµ (Centre Technologique des Microsctructures). Les filaments déposés sous la forme de mat ou de manière organisée ont été métallisés par un dépôt de cuivre de 10 nm par pulvérisation cathodique (Baltec MED 020).

> Microscopie électronique en transmission à balayage (STEM)

De la microscopie électronique en transmission à balayage (Hirashi STEM HD-2300) a été réalisée sur des filaments isolés de PCL avec ou sans NPs d'HAP. Ces observations ont été réalisées par l'étudiant Vivek Menon au sein du LIMMS à Tokyo (Laboratory for Integrated Micro-Mechatronic Systems).

### 2.2.4 Préparation des échantillons

Après élaboration des structures, celles-ci sont décollées du wafer de silicium. Les structures de PCL contenant ou non les NPs d'HAP sont décollées par l'ajout de quelques millilitres d'éthanol alors que les structures PCL/PEG contenant ou non le CEMP1 sont décollées par l'ajout de quelques millilitres d'eau pure. L'éthanol a été évité afin de préserver les protéines. Après décollage, les structures sont rapidement séchées grâce à un flux d'air comprimé dans le but d'éviter toute dégradation de la structure. Le temps de contact entre les structures et l'éthanol est estimé à une dizaine de secondes et pour l'eau, de l'ordre d'une minute.

Concernant l'étape de séchage, le protocole établi dans la partie 2. a été utilisé. Les structures de PCL sont placées dans une étuve à 40°C pendant 6 jours et les structures PCL/PEG sont placées à 37°C pendant 6 jours. La température a été diminuée à 37°C dans le cas des structures pouvant contenir la protéine afin de la préserver d'un chauffage trop important. La teneur en solvant résiduel a ensuite été vérifiée par analyse thermogravimétrique : la perte de masse avant 100°C est de 0,3% pour des filaments de PCL, 0,15% pour PCL+30%HAP et 0,007% pour des filaments cœur-coquille PCL-PEG.

Les structures séchées sont ensuite déposées sur une lamelle de Thermanox<sup>™</sup> de 13 mm de diamètre et placées dans une plaque de culture de 24 puits. Elles sont ensuite maintenues au fond des puits par un joint en PTFE.

Les plaques de culture sont ensuite stérilisées aux UV pendant 40 min.

### 2.2.5 Culture cellulaire

Pour caractériser le potentiel des structures pour la régénération du parodonte, deux types cellulaires ont été utilisés : une lignée de cementoblastes de souris (fournisseur abm, USA) et des cellules humaines du ligament parodontal (Periodontal Ligament Cells, hPDLC du laboratoire de Biomatériaux de l'Ecole de Médecine Dentaire de l'Université de Genève) capables de se différencier en cémentoblastes ou en ostéoblastes (Figure 5-16). Les cultures cellulaires ont été réalisées par Dr. Attik Nina. Les cellules ont été cultivées dans du milieu D-MEM en présence d'antibiotiques (streptomycine et pénicilline, 100U/mL) et 10% de sérum fœtal de veau (SVF). Les cellules sont cultivées à 37°C, en atmosphère humide (95%) et en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu des cellules est renouvelé tous les trois jours.



Figure 5-16 Images au microscope optique de cellules (a) cementoblastes et (b) fibroblastes du ligament parodontal.

Avant leur mise en contact avec les structures, les cellules ont été décollées de leur support à l'aide de trypsine, puis lavées et intégrées dans les puits de culture. Pour les tests de prolifération (Alamar Blue<sup>®</sup>, présenté dans la partie qui suit), la densité des deux types cellulaires a été fixée à 10<sup>4</sup> cellules/mL. En ce qui concerne les tests de reminéralisation (coloration au rouge d'alizarine, présenté dans la partie qui suit), cette densité a été fixée à 10<sup>3</sup> cellules/mL.

### 2.2.6 Caractérisation du comportement biologique

L'ensemble des caractérisations du comportement biologique en lien avec les structures produites ont été réalisées par Dr. Attik Nina.

Test Alamar Blue<sup>®</sup>

L'Alamar Blue<sup>®</sup> est un test colorimétrique non destructif qui utilise un agent capable de se réduire en molécule colorée par l'activité métabolique des cellules. Cette réaction se fait en milieu extracellulaire. La quantité de molécules colorées produite est donc directement reliée à l'activité métabolique des cellules.

Le réactif Alamar Blue<sup>®</sup> est ajouté dans le milieu de culture en présence de cellules et est laissé incubé pendant 6 heures afin que la réaction s'opère. Après réaction, le milieu de culture est prélevé et introduit dans une autre plaque. L'absorbance du milieu présent dans chaque puits de la plaque est déterminée par un spectrophotomètre adapté ou « lecteur de plaque ». L'absorbance du milieu est ainsi déterminée à 570 nm et 600 nm.

Lors de ces essais, chaque condition a été testée selon des échantillons dupliqués. Chaque milieu prélevé sur un échantillon est ensuite divisé en deux. Ainsi, pour chaque échantillon, quatre mesures sont effectuées.

### Coloration au rouge d'alizarine

La coloration des dépôts calciques a été réalisée au rouge d'alizarine. Celui-ci a la capacité de former un complexe avec le calcium et donc de marquer les nodules de reminéralisation. Après réaction du colorant avec le calcium intégré dans les nodules, le colorant est dispersé dans le milieu par l'ajout d'un ammonium quaternaire (chlorure de cétylpyridinium). L'absorbance du milieu est ensuite mesurée à 560 nm.

Chaque condition a été testée selon des échantillons dupliqués. Le milieu prélevé sur un échantillon a ensuite été divisé en deux. Ainsi, pour chaque échantillon, quatre mesures ont été effectuées.

Microscopie électronique à balayage (MEB)

Afin d'étudier la morphologie des cellules en présence des structures, des observations au MEB (Quanta 250, Plateforme CTµ, Centre Technologique des Microsctructures, Lyon) ont été réalisées après culture cellulaire. Pour cela, les cellules sont fixées avec du formaldéhyde (3,7%) puis déshydratées à partir de bains à l'éthanol. L'éthanol est d'abord utilisé dilué puis de plus en plus concentré. Cela permet d'éviter que les cellules ne subissent de modification morphologique. Les échantillons sont ensuite métallisés avec une couche de cuivre de 10 nm.

> Microscopie confocale de fluorescence

Afin d'étudier la colonisation cellulaire (prolifération des cellules à travers la structure) et la structure interne des cellules après culture au contact des échantillons électrofilés, des observations en microscopie de fluorescence ont été réalisées sur un microscope confocal inversé (Leica SP5 X, CIQLE, Lyon). Les images obtenues ont ensuite été traitées par le logiciel LAS AF lite.

Les échantillons ont été préalablement marqués par deux fluorophores différents. L'iodure de propidium (PI) a été utilisé pour marquer l'ADN des noyaux en rouge. Le marquage est réalisé après avoir introduit un détergent (triton X) avec les cellules, ce qui permet de perméabiliser les membranes cellulaires. La phalloïdine couplée à l'Alexa Fluor 488 a été utilisée pour marquer en vert l'actine présente dans le cytosquelette des cellules. Des images en réflexion ont aussi été acquises pour visualiser les structures polymères.

### 2.3 Etude biologique des structures de PCL contenant des nanoparticules d'hydroxyapatite

Les structures de PCL sous la forme de mat ou de structures organisées ont d'abord été caractérisées par des observations au MEB avant d'être mises en contact avec des cémentoblastes puis de cellules du ligament parodontal.

### 2.3.1 Caractérisation des structures

La morphologie et le diamètre des filaments obtenus dans les structures de PCL en forme de mat ou de grille ont été caractérisés par des observations au MEB.

Structures mats de PCL



Figure 5-17 Images MEB des mats obtenues à partir des solutions de PCL, PCL contenant 10% d'HAP et 30% d'HAP et la distribution des diamètres des filaments (réalisée sur 40-60 mesures sur 4-5 zones).

Les images MEB des structures en forme de mat sont présentées en Figure 5-17. Il est d'abord possible de remarquer que la rugosité de surface est différente en fonction de la composition des filaments. Les filaments de PCL présentent des surfaces très lisses alors que la surface des filaments contenant des NPs d'HAP est légèrement plus rugueuse. Cela paraît logique qu'en présence de NPs, la surface des filaments soit légèrement modifiée. Néanmoins, ces images ne permettent pas de savoir si les NPs sont situées sur la surface ou si elles sont enrobées dans la matrice de polymère.

Ces observations ont aussi permis de vérifier les diamètres des filaments obtenus. Une distribution des diamètres mesurés a ainsi pu être tracée (Figure 5-17). La distribution des diamètres mesurés sur les filaments de PCL est centrée sur 3,5 ±0,2  $\mu$ m. Celle des filaments de PCL +10%HAP est centrée sur 3,8 ±0,3  $\mu$ m et celle des filaments de PCL +30%HAP est beaucoup plus large avec un diamètre moyen de

3,8 ±0,5  $\mu$ m. Il semblerait y avoir une double distribution : la première centrée sur 3,8  $\mu$ m et la deuxième centrée sur 4,4  $\mu$ m. Des filaments moins homogènes sont obtenus sur les filaments contenant 30% d'HAP. Cela témoigne donc peut-être de l'hétérogénéité de viscosité des solutions obtenues.

Des images MEB des NPs d'HAP isolées et des images MET des filaments de PCL contenant ou non 30% de NPs sont présentes en Annexe 24 et Annexe 25. Les NPs possèdent un diamètre moyen d'environ 76 nm. Néanmoins, des particules de presque 1 µm de diamètre sont également présentes. Ces particules, plus grosses, ne sont pas nombreuses mais représentent un volume assez important (Annexe 25). La présence de ces particules plus volumineuses pourrait aussi expliquer pourquoi les filaments contenant les NPs présentent des distributions de diamètre plus large. Le diamètre moyen des filaments semble aussi augmenter légèrement avec l'ajout de NPs ce qui pourrait confirmer la viscosité plus importante des solutions composites. Enfin, les images de MET mettent en évidence la présence de particules d'HAP dans tout le volume du filament y compris au niveau de l'extrême surface. Ces images ne permettent pas d'affirmer que les particules émergent à la surface ou restent enrobées dans la matrice de polymère. Dans le deuxième cas, la couche de polymère est certainement de quelques nanomètres d'épaisseur. Nous pourrions alors supposer que si les cellules ne sont pas en contact direct avec les particules au début de la culture, elles peuvent l'être assez rapidement après que le polymère ait initié son processus de dégradation par hydrolyse. Ces résultats indiquent donc que les conditions sont favorables pour espérer mesurer l'effet de différenciation cellulaire (des cellules du ligament parodontal) escompté dans cette étude.

Structures grilles de PCL

Les images MEB des structures organisées en forme de grille produites par électro-impression de PCL et de PCL contenant 30% d'HAP sont présentées en Figure 5-18.

Les murs sont constitués d'un empilement des filaments de très grande précision, et ce, quelle que soit la direction des murs dans le plan XY. Les structures semblent être composées de 20 couches, ou 19 lorsque le filament de la première couche est décalé (voir structure de PCL +30%HAP à moyen grossissement, Figure 5-18). Les écarts entre les murs de filaments de la grille sont compatibles avec le motif théorique (200µm) dans le cas de la structure PCL mais le sont moins dans le cas de la structure de PCL contenant 30% d'HAP. Il semblerait y avoir un décalage de  $\pm$  50 µm sur les 200 µm ciblés. Cette différence n'est sûrement pas liée à la composition de la solution mais sûrement à la variabilité du repositionnement du collecteur amovible qui est estimée à  $\pm$  20 µm. Il est aussi possible de remarquer que les filaments des structures de PCL contenant 30% d'HAP possèdent une rugosité de surface.



*Figure 5-18 Images MEB des grilles formées sur wafer de silicium à partir des solutions de PCL et PCL contenant 30% d'HAP et distribution des diamètres des filaments (réalisée sur une vingtaine de mesures et 2-3 zones).* 

### 2.3.2 Culture des cémentoblastes

Les cémentoblastes ont été cultivés pendant 7 jours sur des structures de PCL avec ou sans NPs d'HAP et sur des structures plus ou moins vieillies. Les structures ont été vieillies pour des temps de 15 jours et de 1 mois afin d'initier le processus de dégradation du polymère qui a d'abord lieu en surface. Cela permettrait alors aux NPs qui sont potentiellement enrobées et proches de la surface, d'émerger de la structure et d'interagir avec les cellules.

Structures non vieillies

Les cémentoblastes ont d'abord été cultivés sur des structures non vieillies sous la forme de mats ou de grilles organisées. Les résultats du test de prolifération et des images en microscopie confocale après 7 jours de culture sont présentés en Figure 5-19.



Figure 5-19 Images de microscopie confocale de cémentoblastes après 7 jours de culture (la barre d'échelle correspond à 50 μm) (a) et résultats d'Alamar Blue<sup>®</sup> obtenus après 1, 3, 5 et 7 jours de culture (b).

Les images en microscopie confocale ont pu révéler la morphologie et le comportement des cémentoblastes en contact direct ou non des structures fibreuses (Figure 5-19 - (a)). Sans structure, les cémentoblastes présentent une morphologie plutôt étalée comme il est possible de l'observer sur l'échantillon « contrôle ». En présence de structure en forme de mat ou de grille, les cellules adhèrent bien à la surface des filaments et leur morphologie s'adapte en fonction des filaments. Sur les mats par exemple, si une cellule n'adhère qu'à un seul filament, la cellule prend alors une forme allongée. Si elle adhère à la surface de plusieurs filaments en même temps, la cellule s'étire dans plusieurs directions sans orientation préférentielle. Le phénomène est moins visible sur les structures en forme de grille car les cellules semblent adhérer sur le côté des empilements de filaments. Les cellules semblent tout de même s'allonger et s'orienter en fonction de la direction des filaments et donc des murs. Cela représente un avantage certain des structures organisées. En effet, en contrôlant

l'orientation des cellules par le motif de la structure, il serait alors possible de contrôler l'organisation des cellules dans l'espace. Cela confirme que l'électro-impression est prometteuse pour produire des structures organisées capable d'optimiser l'organisation des cellules et ainsi régénérer des tissus complexes. Aucune différence de comportement ou de morphologie des cémentoblastes n'est visible en fonction de la composition des filaments. La morphologie des trois structures « grille » est néanmoins différente car elles ont pu se déformer au cours de leur transfert des puits de cultures vers la platine de microscopie confocale.

Les résultats de l'activité métabolique (AM) des cémentoblastes montrent d'abord que l'ensemble des structures testées ne présentent pas de cytotoxicité (Figure 5-19 - (b)). Effectivement, l'AM des cellules en contact avec les structures est équivalente ou plus importante que l'AM de l'échantillon « contrôle » qui ne contient pas de filaments. Il est aussi possible de noter que l'AM évolue différemment en fonction du temps de culture. Pour chaque condition, il ne semble pas y avoir de différence significative de l'AM après 1, 3 ou 5 jours de culture. L'AM augmente cependant brutalement après 7 jours de cultures pour tous les échantillons sauf l'échantillon « contrôle ». Cela montre alors que les structures fibreuses sont capables de stimuler l'activité des cémentoblastes et confirme que les cellules adhèrent sur les filaments.

Les résultats montrent aussi que l'AM est généralement légèrement plus faible sur les structures en forme de grille que sur les structures mats mais l'AM à 7 jours demeure très supérieure à celle des temps plus courts. Les observations en microscopie confocale ont montré que les cellules adhèrent sur les filaments dans les deux configurations, mat et grille (Figure 5-19). Cette différence d'AM est donc peut être liée à une surface spécifique moins importante développée par les structures en forme de grille. Les filaments étant empilés les uns sur les autres, la surface accessible par les cellules est alors moins importante. Le motif de la structure est un paramètre qui n'a pas été étudié au cours de cette thèse mais il s'agit d'un facteur qu'il serait intéressant de prendre en compte afin d'optimiser la prolifération cellulaire. Une étude antérieure avait aussi comparé l'AM de cellules (cellules de calotte murine, MC3T3-E1) sur des structures de PCL en forme de mat et de grille après 7 jours de culture [201]. Une activité équivalente avait été obtenue sur des structures « grille » composées de 25 couches et des filaments en forme de mat. La hauteur des grilles était environ 10 fois plus importante que les structures étudiées au cours de cette thèse. Il n'est donc pas étonnant d'obtenir, dans notre cas, un taux de prolifération moins important compte tenu des dimensions assez faibles de nos structures. De plus, l'étude a montré que l'AM pouvait augmenter lorsque le nombre de couche est doublé, ce qui confirme que l'AM dépend de la surface spécifique de la structure.

Il est enfin intéressant de remarquer que l'AM est influencée par la composition des filaments. Après 7 jours de culture, l'AM des cellules est augmentée de 60 à 120% sur les structures contenant de l'HAP. Cette tendance semble aussi liée à la teneur en NPs puisque l'AM est augmentée de 30 à 60% sur les structures contenant 30% d'HAP par rapport aux structures qui n'en contiennent que 10%. La présence d'HAP au sein des filaments semble donc bien avoir un effet sur les cellules. Il est, néanmoins, délicat de relier ce phénomène à l'interaction direct des cellules avec l'HAP car aucune information ne confirme que l'HAP n'est accessible à la surface des filaments. L'AM pourrait aussi être stimulée par la rugosité de surface des filaments. La rugosité de surface des biomatériaux est un paramètre régulièrement étudié car il s'est avéré intéressant pour améliorer l'adhésion, la prolifération et même induire la différenciation de certains types cellulaires [28]. Cela a été observé dans le cas d'ostéoblastes. Effectivement, dans un milieu in vivo, les surfaces rugueuses permettent une meilleure ostéointégration<sup>9</sup> par rapport aux surfaces lisses. Nous pourrions supposer que l'affinité des cellules

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> L'ostéointégration est un phénomène décrivant l'affinité que développent les cellules osseuses pour un implant, ce qui permet généralement son intégration dans un tissu osseux.

pour les surfaces rugueuses pourrait aussi être le cas des cémentoblastes qui, in vivo, se trouvent dans une matrice minérale.

L'activité cellulaire étant stimulée de manière importante par les filaments contenant 30% d'HAP, cette teneur sera retenue pour la suite de l'étude. Seules les structures en forme de grille seront aussi testées par la suite.

Structures vieillies après 15 jours et 1 mois

Afin de vérifier l'influence directe des NPs d'HAP sur le comportement des cémentoblastes, les structures en forme de grille ont été vieillies. Le but du vieillissement est de débuter le processus de dégradation du polymère en surface, ce qui permettrait de rendre accessibles le plus de NPs possible. Les cultures cellulaires peuvent difficilement durer plus de 15 jours car au-delà, la densité cellulaire devient souvent trop importante ce qui induit un détachement du tapis cellulaire. Les structures ont donc été vieillies sans cellules à 37°C pendant 15 jours et 1 mois dans un tampon salin physiologique (PBS 1X). Après vieillissement, les structures ont été rincées puis ont été mises en contact avec les cellules pendant 7 jours. En parallèle, des structures non vieillies ont aussi été étudiées. Les résultats de prolifération et les images MEB des structures après 7 jours de cultures sont présentés en Figure 5-20.

Les résultats d'AM des cémentoblastes présentent plus de variabilité que sur les premiers résultats (sans vieillissement). Il est alors plus délicat de conclure sur les tendances obtenues. Concernant l'évolution de l'AM en fonction du temps de culture, une tendance inhabituelle est observée pour les échantillons non vieillis à 5 jours. L'AM est diminuée de manière significative puis augmente de nouveau à 7 jours. Cette tendance n'aurait pas vraiment d'explication physiologique. Ce phénomène est donc sûrement lié aux manipulations expérimentales. Les cellules sont rincées plusieurs fois lors des tests Alamar Blue<sup>®</sup>, il est donc possible que l'échantillon s'abîme et qu'une partie des cellules soit évacuée durant les rinçages. Aussi, l'évolution de l'AM n'augmente pas graduellement dans le cas des échantillons vieillis pendant 1 mois. L'AM est significativement réduite à 5 et surtout à 7 jours de culture. Cette diminution est précédée d'une augmentation importante de l'activité cellulaire. On peut émettre l'hypothèse que, dans ce cas, une partie des cellules soit décrochée à cause d'une densité cellulaire trop importante.

De manière plus générale, il est possible d'observer que l'AM des cémentoblastes est plus importante sur les échantillons vieillis 15 jours et l'est davantage sur les échantillons vieillis 1 mois quel que soit la composition des filaments. Cela montre donc que, indépendamment de la présence d'HAP, le vieillissement des structures permet dans tous les cas de stimuler l'activité cellulaire. Ces résultats sont intéressants car ils sont directement liés aux propriétés du polymère qui ont évoluées pendant l'étape de vieillissement. La dégradation du polymère qui correspond à une hydrolyse de ses fonctions ester a donc sûrement pu être initiée pendant le vieillissement. Cette réaction permet de former des fonctions chimiques comme des hydroxyles ou des acides carboxyliques qui ont tendance à augmenter le caractère hydrophile de la surface du polymère. Le traitement de surface de polymère par plasma est une technique reconnue pour stimuler l'adhésion cellulaire car elle est aussi capable de créer des fonctions chimiques réactives à la surface des matériaux [202]. Cette hypothèse expliquerait alors pourquoi l'activité cellulaire est stimulée après vieillissement des structures.



Figure 5-20 Résultats (a) Alamar Blue<sup>®</sup> obtenus sur la culture de cémentoblastes après 1, 3, 5 et 7 jours sur structures de PCL ou PCL+30% HAP non vieillies et vieillies 15 jours ou 1 mois et (b) images MEB. Les flèches blanches indiquent le tapis cellulaire. La barre d'échelle est de 200 μm.

A part pour les échantillons qui n'ont pas été vieillis, il est possible de remarquer que les filaments contenant 30% d'HAP permettent d'augmenter l'AM des cellules d'environ 30% par rapports aux filaments qui n'en contiennent pas. La résolution du MEB utilisé pour l'observation des structures après vieillissement n'est pas suffisante pour affirmer que le vieillissement a pu permettre aux NPs d'émerger de la matrice de polymère (Figure 5-20 - (b)). Des analyses chimiques de la surface des filaments pourraient être effectuées par ToF-SIMS après vieillissement pour confirmer cette hypothèse. A ce stade de l'étude, les différences d'AM ne peuvent donc pas être directement liées au contact des cémentoblastes avec les NPs car celles-ci pourrait aussi être causée par la différence de rugosité des filaments.

### 2.3.3 Culture des cellules du ligament parodontal (PDLC)

Des cultures ont été renouvelées sur les structures organisées de PCL avec ou sans HAP, cette fois, avec des cellules du ligament parodontal (PDLC). Les PDLC sont des cellules capables de se différencier en cellules de type ostéoblastique ou cémentoblastisque. Leur potentiel de différenciation sera donc testé en présence des structures contenant ou non des NPs d'HAP. Pour cela, la prolifération cellulaire et le potentiel de reminéralisation ont été étudiés.

Prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire a été analysée et des observations au MEB ont été effectuées après 5 jours de culture des PDLC. Ces résultats sont présentés en Figure 5-21.



Figure 5-21 Résultats (a) Alamar Blue<sup>®</sup> obtenus sur la culture du ligament parodontal après 1, 3 et 5 jours sur structures de PCL ou PCL+30% HAP (b) et images MEB après 5 jours de culture. Les flèches blanches indiquent le tapis cellulaire. La barre d'échelle est de 100 μm.

L'AM des PDLC après 1, 3 et 5 jours de culture sur les structures en forme de grille est différente des tendances obtenues avec les cémentoblastes. Dans ce cas, la présence de structure sous forme de grille ne semble pas stimuler l'activité cellulaire jusqu'à 5 jours de culture. L'AM est effectivement équivalente ou 20% inférieure par rapport à l'échantillon « contrôle » qui ne contient pas de filaments. Sur les images MEB acquises pour les trois conditions testées, il semblerait que les cellules se localisent préférentiellement sur la surface des lamelles de culture et non sur les structures. Les grilles de PCL ou de PCL contenant 30% d'HAP ne permettraient donc pas de favoriser l'adhésion et la prolifération des PDLC jusqu'à 5 jours de culture. Une étude antérieure avait montré l'influence de filaments de PCL et collagène avec ou sans NPs d'HAP sur la prolifération de PDLC [203]. Les cellules avaient proliféré jusqu'à 3 fois plus sur les deux types de filaments après 7 jours de culture. Ces résultats laissent donc supposer que l'ajout de collagène dans les filaments a une influence sur la prolifération des PDLC. Le

PCL seul serait peut-être trop hydrophobe pour stimuler l'adhésion et la prolifération de ce type cellulaire après 5 jours de culture.

### Potentiel de reminéralisation

Le potentiel de reminéralisation des PDLC en présence de structures de PCL avec ou sans HAP a été étudié par coloration de dépôt de calcium au rouge d'alizarine. Ce test permet de détecter la quantité de nodules de reminéralisation produits par les cellules. Le test a été réalisé après 14 jours de culture des PDLC dans des conditions d'ostéo-induction (sans changement de milieu de culture). L'absorbance du milieu a ensuite été mesurée pour chaque condition et a été normalisée par rapport à l'échantillon « contrôle » qui ne contient pas de filaments. Les résultats sont présentés en Figure 5-22.



Figure 5-22 Résultats de la coloration du calcium au rouge d'alizarine effectuée sur les structures de PCL et de PCL+30% d'HAP après 14 jours de culture de PDLC

Les résultats obtenus présentent une tendance très marquée. La structure de PCL n'induit pas plus de dépôt calcique que l'échantillon « contrôle » alors que la structure contenant 30% d'HAP induit presque 15 fois plus de dépôt calcique. La stimulation de la structure composite sur les PDLC pour reconstruire une matrice minérale est donc évidente.

Dans certaines études de la littérature, l'augmentation du dépôt calcique est assimilée à une différenciation des PDLC en ostéoblastes [204]. Ces affirmations peuvent être cependant discutées car, il a aussi été montré que les PDCL [205] et les cémentoblastes [195] pouvaient induire un processus de reminéralisation. Afin de vérifier le phénotype adapté par les cellules dans cette étude, d'autres tests sont envisagés afin de détecter l'ostéopontine présente au sein des échantillons. L'ostéopontine est une protéine produite par les ostéoblastes lors de leur différentiation dès le stade de « préostéoblaste » [206].

### 2.4 Etude biologique des structures organisées contenant du CEMP1

Les structures de PCL et PEG produites à partir d'une aiguille coaxiale sous la forme de structures organisées (« grilles ») ont d'abord été caractérisées par des observations au MEB avant d'être mises en contact avec les PDLC. Les cultures de ces cellules ont été réalisées en contact direct ou indirect avec les structures. Le contact direct correspond à ce qui a été réalisé jusqu'à présent : mettre en contact les cellules avec la structure. Le contact indirect est réalisé en utilisant le milieu dans lequel a été incubé les structures pendant plusieurs jours dans du milieu sans cellules à 37°C (protocole établi dans la norme ISO 10993). L'objectif est de collecter et concentrer les protéines, présentes au sein des structures, qui seront libérés dans le milieu. Ainsi, il est possible de conclure sur l'influence des agents encapsulés indépendamment de l'influence que pourrait induire la structure.

### 2.4.1 Caractérisation des structures organisées

La morphologie et le diamètre des filaments obtenus dans les structures de PCL et PEG ont été caractérisés par des observations au MEB. Les images MEB des structures en forme de grille produites à partir de l'aiguille coaxiale sont présentées en Figure 5-23.

Les structures obtenues sont beaucoup moins homogènes que les structures obtenues à partir de PCL ou de PCL contenant l'HAP. Il est possible d'observer de nombreux filaments isolés et décalés des empilements formés. Les structures obtenues possèdent donc des pores plus petits que 200 µm, dimension qui correspondait à la distance entre les murs dans le design de départ (GCode). Même si les décalages sont nombreux, il est tout de même possible d'observer des empilements d'au moins une dizaine de filaments (au lieu de 30 initialement dans le GCode).

Les observations MEB ont été réalisées sur des grilles décollées de leur support sur leur face endroit (Figure 5-23, première ligne d'images) et envers (Figure 5-23, deuxième ligne d'images). Les structures ont été observées retournées car elles ont été introduites dans ce sens lors des cultures cellulaires. Dans le cas où les structures sont retournées, il est possible d'observer que les filaments des premières couches se sont étalés sur le support et ne forment plus des cylindres mais des rubans. Cela indique que le filament étiré était encore trop liquide pour garder sa forme cylindrique lors de son dépôt.

Dans le cas du filage de la solution de PEG contenant le CEMP1, le filage n'était pas stable dans le temps. Une goutte apparaissait régulièrement au niveau de la pointe de l'aiguille et avait pour conséquence l'arrêt du filage. Le filage a donc dû être réinitié manuellement au cours de l'impression en nettoyant la pointe de l'aiguille. Cette manipulation a été faite, au plus, une fois sur chaque structure. Il est important de noter qu'une perte de matière a eu lieu durant cette manipulation. Ainsi, la quantité de CEMP1 par structure, initialement déterminée à 3 µg, correspond à une valeur surestimée.

Malgré les instabilités qu'il y a eu sur le filage da la solution contenant la protéine, les deux structures avec et sans protéine sont très similaires. Cela laisse supposer que la présence de décalages dans les structures n'est pas liée à un filage instable (causé par la présence de protéine) mais à un problème de repositionnement du collecteur (Ce problème a été expliqué plus en détail dans le Chapitre 3). Les distributions des diamètres de filaments des structures sont centrées sur 2,5 µm pour les deux types de structure (les diamètres des filaments étalés ne sont pas pris en compte dans la détermination de la distribution de diamètres). Les distributions sont assez homogènes mais elles s'étendent à des diamètres élevés, jusqu'à 10 µm.



Figure 5-23 Images MEB des grilles décollées et produites à partir de l'aiguille coaxiale alimentée par les solutions de PCL et de PEG contenant ou non du CEMP1 (la première ligne correspond à des structures face endroit et la seconde, face retournée). Et distribution des diamètres des filaments (réalisée sur une centaine de mesures et 3-4 zones et deux structures différentes).

### 2.4.2 Culture avec contact direct des PDLC

Des cultures de cellules PDLC ont été réalisées en contact direct avec les structures produites à partir de l'aiguille coaxiale de PCL@PEG contenant ou non le CEMP1. La prolifération cellulaire des PDLC, leur morphologie après 7 jours de culture, ainsi que leur potentiel de reminéralisation ont été étudiés. Lors de ces essais, différentes conditions ont été testées. Les structures de PCL@PEG produites avec l'aiguille coaxiale avec ou sans protéine ont d'abord été testées. Le CEMP1 a aussi été testé indépendamment des structures en l'incorporant directement dans le milieu de culture. Deux concentrations ont été utilisées : 2,5 µg/mL et 3 ng/mL. La concentration la plus élevée (2,5 µg/mL) correspond à la concentration optimale de CEMP1 pour les PDLC, d'après la littérature [207]. Une concentration presque 1000 fois plus faible (3 ng/mL) que la concentration optimale et la teneur en

CEMP1 dans les structures PCL@PEG+CEMP1 a aussi été testée afin de vérifier l'influence de la concentration.

Prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire a été analysée à 1, 3, 5 et 7 jours. Le milieu de culture étant prélevé pour chaque analyse (à 1, 3, 5 et 7 jours), un milieu de nouveau enrichi en CEMP1 a été introduit sur les échantillons « CEMP1 2,5µg/mL » et « CEMP1 3ng/mL » à chaque fois. Les résultats sont présentés en Figure 5-24.



Figure 5-24 Résultats Alamar Blue<sup>®</sup> obtenus sur la culture de PDLC après 1, 3, 5 et 7 jours de culture sur les structures de PCL@PEG produites à partir de l'aiguille coaxiale.

Il est possible d'observer des variations non linéaires de l'AM avec les temps de culture. Ces variations sont néanmoins assez reproductibles sur l'ensemble des échantillons. Après 3 jours de culture, l'AM diminue puis augmente à 5 jours et diminue de nouveau à 7 jours.

La variation de la mesure sur les duplicatas est assez importante, ce qui rend difficile les interprétations sur les tendances obtenues. Concernant les échantillons où le CEMP1 a été introduit dans le milieu, l'AM des PDLC est équivalente ou inférieure à celle de l'échantillon « contrôle » qui n'en contient pas. La présence de CEMP1 aurait donc peut être tendance à légèrement diminuer l'AM des cellules, au moins dans les premiers jours. Une étude antérieure avait montré que le CEMP1 à 2,5 µg/mL pouvait induire un effet légèrement prolifératif sur les PDLC [207]. Ce phénomène semble cependant dépendre de l'environnement cellulaire puisqu'un effet contraire a été obtenu sur une autre étude plus récente [208]. La présence de CEMP1 dans des filaments électrofilés avait, dans ce cas, induit une diminution de la prolifération de PDLC par rapport à des filaments qui n'en contenaient pas. L'influence du CEMP1 sur la prolifération des PDLC n'est donc visiblement pas toujours reproductible.

Concernant les structures avec ou sans CEMP1, aucune différence significative n'est présente. L'AM n'est pas plus stimulée en présence des structures. Ces résultats confirmeraient alors l'hypothèse émise en partie 2.3.3, sur la faible adhésion que développeraient les PDLC pour les filaments de PCL jusqu'à 7 jours de culture. De plus, la présence de PEG ne semble modifier cette tendance.

Observations microscope confocal

Afin de vérifier la morphologie des cellules en fonction de leur environnement et des conditions testées, des observations au microscope confocal ont été réalisées après 7 jours de culture. Les images obtenues sont présentées en Figure 5-25.



Figure 5-25 Images de microscopie confocale des PDLC après 7 jours de culture. Le noyau est marqué en rouge par l'iodure de propidium et l'actine du cytosquelette est marquée en vert par l'Alexa Fluor 488 phalloïdine. En présence de structures « grille », des images en transmission ont aussi été acquises (2 images de droite). La barre d'échelle correspond à 30 μm.

Les PDLC présentent une morphologie très allongée en forme de fibres comme il est possible de le voir sur les images obtenues sur l'échantillon « contrôle ». Cette morphologie a aussi été obtenue après 7 jours de culture en présence de CEMP1 à 2,5  $\mu$ g/mL. Le CEMP1 ne semble donc pas avoir d'influence sur la morphologie cellulaire après 7 jours. Dans le cas où le CEMP1 a été introduit à 3 ng/mL, les cellules ont présenté une morphologie aussi assez allongée mais, par endroits, la morphologie était différente. Comme il est possible de l'observer sur l'image à faible grossissement, les cellules ont parfois adopté une morphologie plus étalée et moins fibreuse. Cette morphologie ressemble à la morphologie des cémentoblastes présentée en partie 2.3.2 (Figure 5-19, page 176).

Concernant les observations réalisées sur les structures, il est possible d'observer qu'une partie des cellules a adhéré à la surface des filaments. Comme pour les observations précédentes, il est difficile de conclure sur la morphologie des cellules présentes sur les filaments car celles-ci sont couchées sur les murs de filaments. Elles semblent tout de même adopter une forme allongée orientée dans le sens des filaments. Par rapport aux images en microscopie confocale obtenues de cémentoblastes sur les structures de PCL, il semblerait que les PDLC adhèrent en plus petit nombre à la surface des filaments.

Potentiel de reminéralisation

Le potentiel de reminéralisation des PDLC en présence de CEMP1 ou des structures PCL@PEG a été testé par coloration de dépôt de calcium au rouge d'alizarine. Le test a été réalisé après 14 jours de culture des PDLC dans des conditions d'ostéo-induction (sans changement de milieu). L'absorbance du milieu a ensuite été mesurée pour chaque condition et a été normalisée par rapport à l'échantillon « contrôle » qui ne contient pas de filaments ni de protéines. Les résultats sont présentés en Figure 5-26.



Figure 5-26 Résultats de la coloration du calcium au rouge d'alizarine effectuée après 14 jours de culture de PDLC avec ou sans CEMP1 (à 2,5  $\mu$ g/mL ou 3 ng/mL) ou sur les structures de PCL@PEG avec ou sans CEMP1.

Comme attendu, des dépôts calciques restreins ont été obtenus pour les échantillons sans CEMP1 « contrôle » et sur la structure PCL@PEG. De manière plus surprenante, une faible reminéralisation a aussi été induite pour l'échantillon contenant 2,5 µg/mL de CEMP1 qui correspond à la concentration généralement utilisée pour stimuler la différentiation des PDLC [207]. Au contraire, un dépôt calcique 17 et 12 fois plus important ont été produits au contact des échantillons contenant 3 ng/mL de CEMP1 et la structure PCL@PEG avec 3 µg de CEMP1, respectivement. Les résultats similaires obtenus sur ces deux échantillons pourraient être expliqué par une libération limitée du CEMP1 des structures dont la quantité se rapprocherait de 3 ng comme l'échantillon « CEMP1 3ng/mL ». Il est étonnant de remarquer que pour les deux échantillons « CEMP1 2,5µg/mL » et « PCL@PEG+CEMP1 » qui contiennent une quantité de CEMP1 similaire, le dépôt calcique n'a pas été produit en même quantité. Il est alors possible que la structure fibreuse soit capable de stimuler la reminéralisation des cellules de la même manière que le CEMP1. Cela expliquerait le dépôt calcique plus important obtenu sur cet échantillon.

Ces résultats sont très encourageants puisqu'il semblerait que, comme les structures composites, les structures contenant le CEMP1 soient capables de stimuler les PDLC pour produire une matrice minéralisée.

En suivant le même raisonnement qu'avec les structures contenant les NPs d'HAP, il serait intéressant de compléter cette étude en analysant le phénotype adopté par les cellules. Une étude de 2016 avait montré que la présence de CEMP1 sur les PDLC induisait la sous-expression de marqueur génique d'ostéopontine. A partir de ces résultats, les auteurs ont conclu que les cellules s'étaient différenciées préférentiellement en cémentoblastes. Afin de caractériser ce phénotype, d'autres marqueurs peuvent être analysés comme le gène du CEMP1 qui est préférentiellement exprimé dans les cellules cémentoblastiques ou du CAP (*cementum-derived attachment protein*) [209].

### 2.4.3 Culture avec contact indirect des PDLC

Une culture de PDLC a été réalisée en contact indirect avec les structures. Pour cela, les structures ont été immergées avec 1 mL de milieu de culture sans sérum (selon la norme ISO 10993) et ont été incubées pendant 14 jours à 37°C en atmosphère humide (95% d'humidité). Afin de vérifier l'influence de l'incubation, du milieu avec ou sans CEMP1 à 2,5 µg/mL ou 3 ng/mL a aussi été incubé dans les mêmes conditions. Après 14 jours, le milieu a été prélevé et a été ajouté en présence de PDLC. La

culture cellulaire a ensuite duré 7 jours avant d'analyser la prolifération cellulaire. Par la suite, les structures incubées pendant 14 jours ont été séchées et observées au MEB.

### > Caractérisation des structures incubées

Les images MEB obtenues sur les structures de PCL@PEG avec ou sans protéines sont présentées en Figure 5-27.



Figure 5-27 Images MEB de différentes grilles de PCL@PEG et PCL@PEG+CEMP1 avant et après incubation de 14 jours. Les flèches noires mettent en évidence les creux ou les trous qui sont apparus après incubation.

La morphologie des structures n'a pas été modifiée par l'incubation dans du milieu pendant 14 jours. Néanmoins, il est possible d'observer que certains filaments ont changé de morphologie. Effectivement, après incubation, des creux ou des trous sont apparus sur certains filaments. Ces reliefs qui n'étaient pas présents avant incubation sont alors sûrement liés à la dissolution et la libération du PEG lors de l'incubation. Ces images permettent ainsi de caractériser la structure des filaments cœurcoquille de manière efficace et confirment les doutes qui avaient été émis sur leur homogénéité. Effectivement, des observations réalisées sur les filaments de PLGA et PEG produits à partir d'aiguilles coaxiales au Chapitre 4 avaient permis d'avancer l'hypothèse que le PEG n'était pas toujours isolé au cœur du filament de PLGA. Cela est confirmé puisqu'il est possible d'observer, dans ce cas, des filaments creusés qui laissent supposer qu'un deuxième filament s'est initialement formé à son voisinage.

La morphologie des filaments de PCL@PEG pourrait induire une cinétique de libération assez originale. Nous pourrions imaginer un profil de libération en deux temps. Une partie de la quantité de protéine au sein du PEG non enrobé par le PCL pourrait diffuser dans le milieu de culture quelques heures après la mise en contact avec les cellules. Une deuxième partie de la quantité de protéine encapsulée avec le PEG au sein du PCL pourrait être libérée, plus tardivement, par diffusion très lente ou grâce à la dégradation du PCL. Cette cinétique de libération en deux temps a d'ailleurs pu être remarquée lors du suivi de la cinétique de libération de la BSA à partir de filaments cœur-coquille du Chapitre 4 (Figure 4-11, page 129).

Prolifération cellulaire

L'objectif étant de comprendre l'influence du milieu provenant de l'incubation, celui-ci n'a pas été changé pendant les 7 jours de culture. Ainsi, la prolifération a été analysée à la fin de la culture (7 jours). Les résultats sont présentés en Figure 5-28.



Figure 5-28 Résultats Alamar Blue® obtenus après 7 jours de culture de PDLC avec contact direct et indirect avec les structures de PCL@PEG produites à partir de l'aiguille coaxiale.

Les résultats de l'AM obtenues avec contact indirect des structures ont été comparés avec les résultats obtenus en contact direct après 7 jours de culture. Les résultats sont très similaires pour chaque condition hormis l'échantillon dans lequel le CEMP1 a été introduit dans le milieu à 2,5 µg/mL. L'AM obtenue avec le contact indirect est plus importante de presque 50% par rapport au contact direct et de 20% par rapport à l'échantillon « contrôle » sans protéines. Ces résultats correspondent alors avec ce qui est cité dans la littérature sur l'effet légèrement prolifératif du CEMP1 à 2,5 µg/mL sur les PDLC [207]. Concernant les résultats obtenus sur les structures, aucune différence significative n'est présente entre le contact direct et indirect. Cela prouve alors que les structures n'ont pas d'influence sur l'AM des PDLC jusqu'à 7 jours de culture.

Le potentiel de reminéralisation des milieux dans lesquels les structures ou le CEMP1 ont été incubés (contact indirect) sur les PDLC est un test aussi envisagé. Il permettra de corréler l'influence de la structure et de la présence de CEMP1 sur le comportement des cellules mais aussi de vérifier la stabilité de la protéine libérée des structures après 14 jours d'incubation.

### 2.5 Conclusion

Cette étude a permis de caractériser l'influence de deux types de structures organisées sur les PDCL pour la régénération des tissus minéralisés du parodonte, l'os et le cément.

Concernant les structures de PCL contenant ou non l'HAP, les cultures avec les cémentoblastes ont d'abord montré que les cellules développaient une grande affinité pour ces structures. L'AM des cellules était effectivement stimulée par la présence des structures dans le milieu ce qui prouve que celles-ci sont capables d'activer des mécanismes comme l'adhésion, la prolifération cellulaire et la colonisation cellulaire. De plus, le comportement des cémentoblastes en contact avec des structures « mat » ou organisées en « grille » a été comparé. Les structures de type mat augmentent significativement leur AM par rapport aux structures organisées. Les images de microscopie confocale semblent, pourtant, montrer que les cellules adhèrent de manière similaire sur les deux types de structures. Cette différence d'AM est alors sûrement liée à la différence de surface de contact développée par les deux types de structures. Plus la surface spécifique est importante, plus les cellules peuvent proliférer. La géométrie des structures n'a pas été étudiée ici, mais il serait intéressant de l'optimiser lors de futurs essais afin de développer la surface spécifique des structures. Cela pourrait être réalisé en diminuant, par exemple, la dimension des pores, en augmentant l'épaisseur des structures, ou en produisant des pores interconnectés. Ces derniers pourraient être obtenus en créant (volontairement) des décalages dans les murs. Les cultures des cémentoblastes ont aussi montré l'influence de la présence de NPs d'HAP au sein des filaments. L'AM des cellules a été augmentée jusqu'à 100% par la présence de NPs. Ces résultats pourraient être expliqués par la stimulation des cémentoblastes par le contact direct avec l'HAP ou le contact avec une surface rugueuse. L'influence de l'HAP est particulièrement étudiée avec des cellules ostéoblastiques dans la littérature. Les cellules sont à la fois stimulées par la présence d'HAP [210] mais aussi par la présence de surface rugueuse [211]. Nous pourrions alors supposer que les cémentoblastes qui se développent aussi naturellement dans une matrice minérale, pourraient répondre aux mêmes stimuli.

L'influence des structures de PCL contenant ou non de l'HAP sur les PDLC a aussi été étudiée. Dans ce cas, les comportements cellulaires comme l'adhésion ou la prolifération n'ont pas été stimulés par les structures en forme de grille après 7 jours de culture. Effectivement, l'AM des PDLC était similaire voire légèrement inférieure à l'échantillon « contrôle ». Pourtant une étude avait montré que ces cellules pouvaient proliférer davantage sur des filaments de PCL et collagène avec ou sans NPs d'HAP [203]. Cela laisse alors supposer que le PCL seul ne permet pas de stimuler la prolifération des PDLC. D'autre part, les résultats laissent aussi penser que les cellules n'ont pas pu interagir avec les NPs car la stimulation que pouvait induire la présence d'HAP sur le prolifération des PDLC a déjà été démontré dans la littérature [197]. Après 7 jours de culture, les NPs restent encore probablement enrobées dans la matrice de polymère. Les tests de reminéralisation ont montré de manière surprenante qu'après 14 jours de culture, les PDLC répondent d'une autre manière aux stimuli créés par les structures contenant de l'HAP. Effectivement, les cellules produisent de manière plus importante des nodules minéralisés lorsqu'elles sont en contact avec les structures composites, ce qui prouve leur potentiel pour régénérer efficacement des tissus durs. Ces résultats laissent aussi supposer que les cellules interagissent de manière plus importante avec les structures sur des temps de culture plus long. Après 14 jours de culture, les NPs sont donc peut-être plus accessibles.

Les structures de PCL et de PEG contenant ou non le CEMP1 ont aussi été étudiées. La géométrie des structures est moins homogène que dans le cas du PCL seul ou avec HAP. Cela est sûrement lié à l'incertitude de repositionnement du plateau. Néanmoins, il a été possible d'observer, grâce aux structures incubées, que la solution de PEG contenant la protéine est par endroits encapsulée dans la

matrice de PCL, alors que sur d'autres endroits, des filaments de PEG et PCL semblent avoir été formés côte à côte. Une optimisation de l'encapsulation du PEG dans les filaments de PCL pourrait être effectuée en jouant par exemple sur le rapport de viscosités des solutions ou le rapport de débits utilisés. Néanmoins ces structures pourraient présenter un profil de libération du PEG et de la protéine assez intéressant. Afin de vérifier cette hypothèse, un suivi de la cinétique de libération pourrait être réalisé à partir d'un dosage par ELISA par exemple. Les cultures cellulaires de PDLC sur ces structures ont montré que les cellules interagissaient peu avec celles-ci. Comme dans le cas des structures de PCL avec HAP, les cellules semblent adhérer préférentiellement à la lamelle plutôt que sur les structures. Cela confirme alors que les PDLC interagissent peu avec le PCL jusqu'à 7 jours de culture. Aussi, la présence de PEG ne semble pas inverser la tendance. Néanmoins, après 14 jours de culture, les cellules ont initié un processus de reminéralisation particulièrement marqué en présence de 3 ng/mL de CEMP1 et de structures contenant la protéine. **Ces résultats sont intéressants car ils montrent d'abord que, même en faible quantité (3 ng/mL), le CEMP1 peut stimuler efficacement les PDLC pour régénérer une matrice minérale et que les structures fibreuses avec CEMP1 sont capables d'induire une reminéralisation des cellules.** 

Cette étude a montré le mécanisme de reminéralisation que les cellules étaient capables d'initier au contact des structures contenant l'HAP et des structures contenant le CEMP1. Ces résultats montrent alors le potentiel de ces deux matériaux pour la régénération de tissus minéralisés. L'étape suivante consisterait à déterminer le phénotype qu'adoptent les cellules en contact avec les deux types de structure. Cela pourrait être vérifié en quantifiant la production d'ostéopontine qui est une protéine caractéristique de la différenciation ostéoblastique [206]. La différenciation cémentoblastique pourrait aussi être vérifié en quantifiant l'expression génique par PCR de CEMP1 ou CAP comme cela a déjà été réalisé dans la littérature [209].

Dans le cas où les cellules n'adoptent pas le même phénotype sur les deux types de structures, il serait alors intéressant d'étudier le potentiel de structure comportant un gradient de composition. Nous pourrions alors espérer pouvoir contrôler localement la différentiation des PDLC en ostéoblastes ou en cémentoblastes comme cela se fait naturellement au niveau du parodonte. Les essais préliminaires pour produire une structure à gradient de propriétés ont pu montrer la possibilité de superposer des filaments de deux compositions (Figure 5-29).



Figure 5-29 Image MEB d'un mur de 10 filaments avec un gradient de propriété. Les cinq premières couches correspondent à cinq filaments de PCL et les cinq autres couches correspondent à cinq filaments de PCL contenant 30% d'HAP.

Plusieurs murs de 10 filaments ont été obtenus. Les cinq premières couches sont produites à partir d'une solution de PCL alors que les cinq dernières couches sont produites à partir d'une solution composite de PCL avec 30% d'HAP. Cette structure a été produite lors d'une même impression à partir de deux aiguilles différentes.

### **CONCLUSION GENERALE**

L'objectif principal de ce travail de thèse a été de développer la technique d'électro-impression voie solvant pour répondre aux problématiques liées à l'ingénierie tissulaire. Pour cela, la technologie permettant de localiser le dépôt de filaments micrométriques sous champ électrique a été développée, étudiée et optimisée. Il a ainsi été possible d'une part d'accroître le nombre de matériaux pouvant être utilisé, et d'autre part d'augmenter l'épaisseur des structures produites. Une partie des travaux a été ensuite consacrée à la protection de protéine au cours du procédé de filage sous champ électrique par l'étude de la structure secondaire d'une protéine modèle. Enfin, des structures fibreuses comportant des protéines, et produites sous champ électrique, ont été testées par le biais de cultures cellulaires pour vérifier leur potentiel de régénération. Des applications de régénération hépatique puis parodontale ont été étudiées.

Comme expliqué précédemment, une étude fondamentale a d'abord été menée pour comprendre les mécanismes de stabilisation du jet de polymère sous champ électrique à partir des propriétés viscoélastiques. Les solutions de trois couples polymère-solvant comme le PEO-Eau, PLGA-HFIP et le PCL-HFIP ont été caractérisées selon leur viscosité ou leur élasticité en fonction de leur concentration et de la masse molaire du polymère. En complément de cette étude, la morphologie des matériaux obtenus a aussi été caractérisée en fonction des propriétés viscoélastiques. Pour les trois couples polymère-solvant, la stabilité du jet sous champ électrique caractérisé par la longueur de jet stable (US) a augmenté significativement en fonction des propriétés viscoélastiques. Cela confirme donc que les instabilités peuvent être gommées par la maîtrise des propriétés viscoélastiques. Il a même été remarqué qu'au-delà d'un seuil de concentration, les instabilités ne réapparaissent plus, même en augmentant la distance de travail. Le seuil de viscosité ou d'élasticité à partir duquel les instabilités disparaissent dépend du polymère et visiblement de sa masse molaire. Pour le PEO avec un très haut poids moléculaire (5 MDa) par exemple, des jets stables ont été obtenus à partir d'une solution de concentration, de viscosité et d'élasticité plus faibles que dans le cas des autres solutions de polymère. Concernant la morphologie des matériaux obtenus, une tendance assez générale a pu se dessiner : du spray a été obtenu pour des solutions diluées, des filaments perlés pour des solutions semi-diluées et des filaments uniformes pour des régimes enchevêtrés. Pour des concentrations encore plus élevées, des structures étonnantes composées de filaments enroulés sur eux-mêmes ont aussi pu être obtenues pour les trois polymères. Ces structures ont été produites à chaque fois à partir d'un jet stable jusqu'au collecteur. Ces tendances ont été observées pour l'ensemble des polymères exceptés encore une fois pour le PEO de haut poids moléculaire. Celui-ci a permis de produire des filaments à partir de solutions diluées et un jet liquide a atteint le collecteur lorsque celui-ci était stable ce qui n'a pas permis de produire des structures enroulées. Aucun lien n'a pu être établi entre la morphologie des matériaux obtenus et la viscosité ou l'élasticité des solutions. Cela laisse donc supposer que la viscosité et l'élasticité des solutions ne doivent pas être seulement prises en compte pour cette étude. L'évolution des propriétés viscoélastiques du jet en fonction de l'évaporation du solvant a aussi été étudiée. Pour cela, le diamètre et la vitesse du jet ont été déterminés pour trois solutions de PEO, PLGA et PCL. A partir de ces valeurs expérimentales ont été extraites des courbes de tendances ce qui a permis de s'affranchir des variations liées aux incertitudes sur les mesures de diamètre et de vitesse. C'est alors à partir de ces valeurs théoriques que les débits de solution au sein du jet et les taux d'évaporation du solvant ont été estimés pour les trois solutions en fonction de la distance de l'aiguille. Ces résultats ont pu mettre en évidence les différents régimes de vitesse ou taux

## d'évaporation qu'adopte le jet de polymère lorsque le solvant s'évapore. Il est envisagé de poursuivre l'étude en déterminant l'évolution de la viscoélasticité en fonction de la distance de l'aiguille puis de la corréler avec à la trajectoire du jet.

Les conditions de dépôt ont ensuite été optimisées pour une solution de PCL-HFIP et PLGA-HFIP. Des conditions très stables ont été obtenues pour la solution de PCL contrairement à la solution de PLGA. L'étude s'est poursuivie par l'analyse des mécanismes d'empilement en dépôt localisé. Les tests ont montré une forme d'attraction entre les filaments pour des hauteurs de structures faibles alors qu'une forme de répulsion était observée pour des structures d'épaisseur plus importante, supposant une influence forte de la densité de charges électriques résiduelles sur la surface des filaments. Afin d'éviter ces phénomènes de répulsion, la surface de la structure a été traitée selon différentes stratégies pour éliminer les charges potentiellement présentes. L'augmentation de l'humidité de l'environnement pendant le dépôt a rendu possible la fabrication de structures sans défauts avec une plus grande hauteur, ce qui laisse penser que l'humidité a la capacité d'éliminer une partie des charges électriques. L'effet n'a pas été visible lorsqu'un air humide est localement injecté sur la structure au cours de pauses pendant la production. Il semblerait donc que les filaments déjà déposés se déchargent plus difficilement que le jet de polymère en atmosphère humide. Les tests ont aussi montré qu'un air ionisé ou l'utilisation des deux polarités du champ électrique pour produire les structures pouvaient avoir une influence intéressante sur la limitation des défauts d'empilement. Cependant, des tests devraient être renouvelés afin de confirmer ces tendances.

L'étude de la structure secondaire par DC de la BSA en présence de solvant organique HFIP, de polymère PEG et PLGA et après électrofilage a ensuite été effectuée. Les résultats ont montré que la structure de la BSA était légèrement modifiée par l'HFIP, très peu par la présence de PEG jusqu'à 10% en solution, et semblait aussi peu modifiée par la présence de PLGA jusqu'à 0,1% en solution. La structure de la BSA a ensuite été étudiée après électrofilage avec du PLGA, dans un mélange PLGA-PEG à 10 et 30% de PEG et à partir d'aiguilles coaxiales PLGA-PEG. Les spectres de DC de la BSA, après avoir été filée puis dissoute dans l'HFIP, n'ont pas pu être exploités du fait de la qualité insuffisante des spectres. La différence de concentration de PLGA avec les échantillons « référence », bien que faible, est sûrement la cause de ces résultats discutables. Le PLGA présente effectivement un signal DC intense à faible concentration et dans la même gamme de longueur d'onde que la BSA. Un spectre DC de la BSA, après avoir été libérée dans l'eau à partir de filaments de PLGA, a tout de même montré que la BSA adoptait une structure proche de sa structure native. Il semblerait donc que le procédé de mise en forme n'altère pas de manière irréversible la structure et les propriétés biologiques de la BSA. Le suivi de la cinétique de libération a également montré qu'une quantité plus importante de BSA était libérée à partir de filaments cœur-coquille et à partir de filaments contenant 30% de PEG. Néanmoins ces résultats restent à être confirmés.

Par la suite, l'étude de la bioactivité de filaments de PLGA contenant de l'HGF pour la régénération hépatique a été conduite. Cette étude modèle a été réalisée sur des filaments déposés aléatoirement par électrofilage conventionnel et sur des cellules hépatiques cancéreuses HepG2. Les échantillons ont d'abord été conditionnés pour la culture cellulaire : la stérilisation UV a par exemple été choisie et un traitement par dépôt de collagène a été réalisé pour améliorer l'adhésion des cellules. La bioactivité de l'HGF présent dans les filaments a ensuite été caractérisée par des tests de prolifération cellulaire, et par le suivi du processus signalétique induit par l'interaction entre l'HGF et les cellules. Les résultats obtenus sur les tests de prolifération et la détection du récepteur c-Met ont suggéré que les cellules en contact avec les filaments de PLGA étaient capables d'interagir avec l'HGF encapsulé dans les filaments. Cependant, de manière surprenante, les résultats obtenus sur les échantillons « contrôle » (sans filaments) et dans lesquels l'HGF a été introduit dans le milieu de culture, semblent montrer

qu'au contraire les cellules n'interagissent pas avec la protéine. Ce résultat étrange a conduit à une discussion concernant l'influence de l'encapsulation de la protéine par les filaments, en lien avec des travaux de la littérature. L'influence que pourrait avoir le diamètre des filaments sur la prolifération cellulaire a aussi été discutée à partir des systèmes suivants : PLGA, PLGA+HGF1X, PLGA+HGF10X.

Des tests ont été également réalisés sur des structures fibreuses pour la régénération parodontale. La culture de cémentoblastes, réalisée sur des structures sous forme de mat électrofilé ou de grille électro-imprimée, a permis de montrer l'avantage des structures organisées pour orienter les cellules dans l'espace. Des cultures de PDLC capables de se différencier en cémentoblastes ou ostéoblastes ont ensuite été réalisées. La culture de PDLC sur les structures composite PCL avec 30% d'HAP a d'abord mis en évidence une stimulation des cellules pour produire un dépôt minéralisé. La même tendance a été observée après culture de PDLC sur des structures composées de filaments cœurcoquille PEG-PCL comportant du CEMP1. Cela démontre alors que la protéine a été libérée des filaments et a pu interagir avec les cellules. Ces premiers résultats mettent donc en avant le potentiel de ces structures pour la régénération des tissus durs. Il est, par la suite, envisagé de continuer l'étude en caractérisant le phénotype adopté par les cellules en présence de structure composite et en présence de structure contenant la protéine CEMP1. Nous supposons que dans le premier cas, les cellules pourraient s'être différenciées en ostéoblastes alors que dans le deuxième cas, en cémentoblastes. La présence simultanée de nanoparticules d'HAP et de protéines de type CEMP1 conduit à la formation d'un gradient de propriétés dans une même structure. Ce travail ouvre la voie à la régénération de plusieurs types de tissus à partir d'un seul dispositif médical résorbable, grâce au contrôle de la localisation et de la nature des différenciations et/ou proliférations cellulaires qui peuvent avoir lieu.
### PERSPECTIVES

L'électro-impression pour l'ingénierie tissulaire est un sujet d'étude actuellement très dynamique pour lequel de nouvelles études sont publiées régulièrement. Ce travail de thèse a permis de faire avancer quelques voies mais aussi d'ouvrir de nouvelles perspectives de développement. Ces perspectives ont été organisées selon les différentes problématiques de l'ingénierie tissulaire : les matériaux, les géométries et la bioactivité.

- Matériaux

Ce travail de thèse a permis de montrer qu'en augmentant les propriétés viscoélastiques des solutions de polymère, des jets très stables pouvaient être obtenus et donc être utilisés en électro-impression. Les tests sur le PEO de très haut poids moléculaire ont notamment montré que par l'ajout d'une faible quantité de polymère, des jets très stables étaient obtenus. Ces résultats ont été récemment exploités pour le développement de solutions à la formulation complexe pour produire des filaments de phosphate de calcium. Par l'ajout d'une faible quantité de PEO de haut poids moléculaire dans la solution, le jet est devenu très stable sous champ électrique. Cela reste à être vérifié mais cette stabilisation est sûrement liée à la longueur des chaînes de polymère. Ces premiers résultats préliminaires montrent donc l'intérêt de ce polymère pour développer de nouvelles formulations et donc de nouveaux matériaux pour l'électro-impression.

Les cultures cellulaires réalisées au cours de ce travail de thèse ont montés que les cellules pouvaient de temps en temps présenter une adhésion limitée à la surface des matériaux résorbables (cas du PLGA avec HepG2). Afin d'améliorer l'adhésion cellulaire, des mélanges de polymères résorbables et de protéine de matrice extra-cellulaire comme le collagène, la fibronectine ou la laminine pourraient être utilisés. Cela a déjà montré des résultats intéressants en électrofilage traditionnel avec du PLA (acide polylactique) dans l'HFIP [212]. Des matériaux conducteurs ou des matériaux sensibles à leur environnement pourraient aussi être testés. Le dépôt localisé de filaments conducteurs pourraient, par exemple, avoir des applications intéressantes pour la régénération ou l'étude du comportement de cellules sensibles aux stimuli électriques (cellules cardiaques ou neuronales). Des études antérieures ont effectivement montrés l'intégration de nanotubes de carbones [213] ou de polymère PEDOT : PSS (poly (3,4-ethylènedioxythiophène)-acide polystyrène sulfonique)) [214] pour produire des filaments conducteurs par électrofilage. Le dépôt localisé de matériaux sensibles à leur environnement pourrait aussi avoir des applications intéressantes. Le groupe de recherche de Seema Agarwal a par exemple montré la possibilité de produire des membranes électrofilées sensibles au pH ou à la température en produisant une membrane bi-couche de TPU (polyuréthane) et de filaments alignés de poly (NIPAM-AA) (poly(N-isopropylacrylamide-co acide acrylique)) [215]. En réponse à un changement de pH ou de température, les membranes sont capables de s'enrouler dans le sens d'alignement des filaments. Le dépôt localisé permettant de diriger les filaments à souhait, des structures enroulées originales pourraient être imaginées. Pour des applications d'ingénierie tissulaire, il serait possible d'imaginer des membranes capables de se plier en capillaires très fins pour la régénération de vaisseaux sanguins. Des stents bioactifs capables de dilater des vaisseaux sanguins lors d'un chauffage à 37°C pourraient aussi être envisagés.

L'intégration de deux pousse-seringues au sein de l'imprimante permet d'envisager des structures plus complexes composées de plusieurs matériaux. Cet atout sera certainement exploité dans un futur proche pour produire des structures bi-couches pour la régénération parodontale. D'autres structures pourraient aussi être envisagées. Une étude de 2012 avait montré la possibilité de concentrer de la

BSA à la surface ou au cœur de filaments en changeant la polarité du champ électrique [157]. Il serait donc intéressant de produire des structures avec protéines et avec deux polarités afin d'étudier l'influence de la surface des filaments sur le comportement cellulaire. De manière générale, ce système permettrait effectivement d'étudier les comportements cellulaires en réponse à deux matériaux de propriétés différentes.

- Géométries

La géométrie de la structure n'a pas été un paramètre étudié au cours de cette étude. Néanmoins, les tests réalisés ont montré que la surface spécifique développée par les grilles produites n'était sûrement pas optimisée. Une densité cellulaire plus importante pourrait être obtenue par l'optimisation de la géométrie. Il serait par exemple intéressant de tester des structures dont les carrés des grilles sont interconnectés en créant des décalages dans les empilements. Cela impliquerait de pouvoir déposer des filaments et des empilements suspendus sur d'autres empilements Les conditions devront alors être soigneusement choisies pour éviter que perpendiculaires. l'empilement ne s'affaisse sous le poids ou sous l'attraction électrostatique du collecteur. Pour éviter un affaissement, un support mécanique hydrosoluble pour être envisagé dans les pores avant le décalage des empilements. On pourrait par exemple imaginer un système d'électrospray capable de disperser une solution aqueuse ou un hydrogel au sein des pores au cours d'une pause dans l'impression des filaments. La structure finale ressemblerait à une structure fibreuse encapsulée par une matrice d'hydrogel ou de polymère hydrosoluble capable d'être rapidement éliminée. Ce développement impliquerait cependant d'être capable de déposer des filaments sur un support non conducteur.

Les tests préliminaires réalisés sur l'utilisation d'un air ionisé ont montré des résultats prometteurs. En plus de pouvoir, peut-être, augmenter l'épaisseur des structures, l'air ionisé semble aussi permettre le dépôt localisé de filaments sur des supports non conducteurs. Cela laisserait donc la possibilité de déposer des structures organisées sur n'importe quel support. Les structures biomimétiques pourraient, par exemple, être directement produites sur lamelle de culture. On pourrait aussi imaginer déposer des structures organisées sur des supports déjà nano- ou macro-structurés. Des structures aux détails, nano-, micro- et millimétriques pourraient alors être envisagées pour la régénération de tissus plus volumineux voire même d'organes.

- Bioactivité

L'encapsulation et la délivrance contrôlée de protéines à partir de structures biomimétiques est un atout majeur. Pourtant, à ce jour, encore peu de dispositifs y parviennent efficacement. Dans notre cas, les résultats ont pu montrer qu'en fonction des protéines, celles-ci pouvaient rester adsorbées sur le polymère, être dénaturées ou être libérées en grande quantité dans les premières heures. Il semble donc nécessaire d'accorder du temps pour développer ces systèmes. Les mécanismes de libération de protéines au sein des filaments ne sont pas bien compris mais semblent souvent indépendants de la dégradation du polymère résorbable. Il serait intéressant d'étudier les phénomènes de diffusion des protéines dans les filaments pendant l'incubation comme cela a été réalisé avec des particules de triglycérides [216]. L'ajout de PEG avec un polymère résorbable est intéressant pour protéger la protéine de sa dénaturation ou son adsorption néanmoins cela induit sa libération rapide. Pour maintenir une libération continue, l'utilisation de particules composées de copolymère intégrant du PEG a montré des résultats intéressants pour éviter l'effet « burst » dans la littérature [217]. Parmi les systèmes mis en place pour encapsuler des protéines dans la littérature, il est possible de citer l'utilisation de liposomes, de micro- ou nanoparticules ou d'hydrogels. Il serait intéressant d'intégrer des systèmes déjà optimisés comme des nanoparticules dans la solution de polymère et donc dans les

filaments. Cela pourrait peut-être éviter les problématiques de distribution hétérogène de la protéine liées aux phénomènes de diffusion ou d'attraction électrostatique. Cela a déjà été réalisé avec des particules de phosphate de calcium, PEG et du CEMP1 enrobé dans des filaments de PCL avec collagène [208]. La libération du CEMP1 a été assez linéaire au cours du temps.

- Combiner les technologies

Combiner les technologies et les savoirs permet généralement d'aboutir sur des techniques très innovantes. L'électro-impression qui est une combinaison de l'électrofilage et de la fabrication additive en est un parfait exemple. Toujours dans le but de complexifier les structures produites, cette technique d'électro-impression pourrait être couplée à des canaux microfluidiques. Des canaux bioactifs pourraient, effectivement, être produits par électro-impression et être intégrés dans un circuit de microfluidique. Cela permettrait de produire des études poussées sur les mécanismes de régénération cellulaire dans un environnement dynamique, 3D et bioactif.

# ANNEXE



Annexe 1 Graphiques utilisés pour déterminer la viscosité intrinsèque de chaque couple de polymère utilisé: PEO-Eau, PLGA-HFIP, PCL-HFIP.



Annexe 2 Graphiques des diamètres et des vitesses de jet mesurées par PIV pour la solution de PEO à 0,17 g/mL.



Annexe 3 Graphique des évolutions des vitesses déterminées par VIP ou VLD en fonction de la distance de l'aiguille et en fonction des conditions de température et d'humidité.



Annexe 4 Distribution des diamètres de filaments de PLGA mesurés en fonction du champ électrique utilisé en électrofilage. La distribution est réalisée à partir de 30 à 60 mesures.



Annexe 5 Fluctuation de la vitesse U et V en fonction du temps du jet de PEO à 0,2, 4 et 8 mm de distance de l'aiguille.



Annexe 6 Fluctuation de la vitesse U et V en fonction du temps du jet de PLGA à 0,2, 4 et 8 mm de distance de l'aiguille.



Annexe 7 Fluctuation de la vitesse U et V en fonction du temps du jet de PCL à 0,5, 4 et 8 mm de distance de l'aiguille.



Annexe 8 Détermination du flux d'évaporation d'une goutte de solution de polymère déposé sur un substrat XX. (a) Détermination de l'évolution du volume V et de la surface S de la goutte en fonction du temps à partir d'un goniomètre (KRUSS Drop shape Analyser DSA20 et EasyDrop system). (b) Détermination du flux à partir de la droite V/S en fonction du temps. (c) Liste des flux calculés pour des solutions de PEO dans l'eau et PLGA dans l'HFIP.



Annexe 9 Résultats des débits de solution au sein du jet déterminés à partir des valeurs de rayons et de vitesses pour les solutions de PEO-Eau, PLGA-HFIP et PCL-HFIP. La première colonne de graphiques correspond aux rayons et vitesses et la seconde colonne correspond au débit de solution au sein du jet et débit de solvant évaporé en fonction de la distance de l'aiguille.



Annexe 10 Comparaison des motifs d'enroulement de l'écoulement de fluide visqueux. (a) Motifs obtenus par l'écoulement d'un fluide visqueux par simulation et expérimentalement [11]. (b) Motifs obtenus sous champ électrique en électro-impression [1]. (c) Motifs obtenus dans le cadre de la thèse sous champ électrique en électro-impression.



Annexe 11 Exemples d'images optiques prises avec une caméra de la goutte de solution de PLGA formée à la pointe de l'aiguille après un dépôt en champ proche de quelques minutes.



Annexe 12 Influence de la distance entre 1 et 100  $\mu$ m entre les dépôts localisés de filament. Vignette du haut: motifs de déplacement de l'aiguille sur le collecteur dessinant des lignes espacées de 1, 50 ou 100  $\mu$ m (schéma non à l'échelle). Vignette du bas : structure fibreuse obtenue en fonction des déplacements imposés. Les filaments sont isolés ou empilés et espacés, pour chaque condition, d'environ 100  $\mu$ m.



Annexe 13 Images obtenues par microscopie confocale de filaments produits avec une aiguille coaxiale contenant au cœur de la BSA fluorescente. (a) Filament obtenu. (b) Succession d'images réalisées en faisant varier la hauteur du plan de focalisation du laser d'une extrémité à l'autre du filament.



Annexe 14 (a) Images optiques des filaments de PLGA, PLGA HGF 1X et PLGA HGF 10X déposés par électrofilage sur lamelle. (b) Image optique traitée par logiciel Image J pour déterminer le taux de recouvrement des filaments sur la lamelle. Le pourcentage de taux de recouvrement a été déterminé au sein des carrés rouges afin d'éviter les artéfacts présents sur les bords de l'image sûrement créés à cause d'une netteté différente de l'image. Barre d'échelle : 50µm.

Filament PLGA



Annexe 15 Courbes ATG/sDTA obtenues à partir de filaments de PLGA après électrofilage et après séchage pendant 1 nuit à 40°C sous vide. La courbe de perte de masse est en noir. La dérivée de la courbe de perte de masse est en vert et la courbe du signal SDTA est en orange (Analyse Simultanée Thermique Différentielle).





Annexe 16 Courbes ATG obtenues à partir de filaments de PLGA après 4 et 6 jours à 40°C. La courbe de perte de masse est en noir. La dérivée de la courbe de perte de masse est en vert et la courbe du signal sDTA est orange (Analyse Simultanée Thermique Différentielle).

### Sans stérilisation



Ethanol



Annexe 17 Courbes DSC réalisées sur des filaments de PLGA non stérilisés et stérilisés à l'éthanol.

#### Antibiotique



UV



Annexe 18 Courbes DSC réalisées sur des filaments de PLGA stérilisés aux antibiotiques et aux UV.



#### Echantillons CONTROLES

Annexe 19 Images prises par microscopie de fluorescences et microscopie électronique à balayage (MEB) pour les échantillons sans filaments stérilisés selon les trois méthodes testées.



Annexe 20 Images prises par microscopie de fluorescences et microscopie électronique à balayage (MEB) pour les échantillons avec filaments stérilisés selon les trois méthodes testées.



Annexe 21 Histogramme des diamètres (réalisé sur une vingtaine de mesures) et images MEB des filaments de PLGA sans ou avec HGF1X et HGF10X obtenus sur les membranes monocouches.



Annexe 22 Histogramme des diamètres (réalisé sur une vingtaine de mesures) et images MEB des filaments de PLGA sans ou avec HGF1X et HGF10X obtenus sur les membranes multicouches.

		Solution de la coquille	Solution de cœur	
		PCL	PEG	PEG + CEMP1
Concentration (g/mL)	PCL	0,26	-	-
Concentration (g/mL)	PEG	-	0,23	0,23
Concentration (mg/mL)	CEMP1	-	-	1,5

Annexe 23 Composition des solutions d'HFIP utilisées pour produire les structures contenant le CEMP1. Les concentrations sont calculées à partir de la masse du produit sur le volume total de la solution.



Annexe 24 Images de microscopie électronique en transmission de filament isolé de PCL et de PCL contenant 30% d'HAP.



Annexe 25 Image MEB des NPs d'HAP et distribution de leur diamètre (réalisée sur 190 mesures et une zone) en fonction de leur nombre (fréquence) et en fonction de leur volume (pourcentage volumique).

# REFERENCES

- H. Naderi, M. M. Matin, and A. R. Bahrami, "Review paper: Critical issues in tissue engineering: Biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems," J. Biomater. Appl., vol. 26, no. 4, pp. 383–417, 2011.
- [2] S. N. Bhatia and D. E. Ingber, "Microfluidic organs-on-chips," *Nat. Biotechnol.*, vol. 32, no. 8, pp. 760–772, 2014.
- [3] J. C. Middleton and A. J. Tipton, "Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices," *Biomaterials*, vol. 21, no. 23, pp. 2335–2346, Dec. 2000.
- [4] A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli, and N. K. Karamanos, "Extracellular matrix structure," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 97, pp. 4–27, Feb. 2016.
- [5] M. P. Lutolf and J. a Hubbell, "Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 23, no. 1, pp. 47–55, 2005.
- [6] C. J. Bishop, J. Kim, and J. J. Green, "Biomolecule Delivery to Engineer the Cellular Microenvironment for Regenerative Medicine," Ann. Biomed. Eng., vol. 42, no. 7, pp. 1557– 1572, 2014.
- [7] H. F. Rios, Z. Lin, B. Oh, C. H. Park, and W. V Giannobile, "Cell- and gene-based therapeutic strategies for periodontal regenerative medicine.," J. Periodontol., vol. 82, no. 9, pp. 1223– 1237, 2011.
- [8] T. Friedmann, "La thérapie génique, promesses et limites," *Pour Sci.*, no. 241, pp. 60–65, Nov. 1997.
- [9] W. Ji *et al.*, "Bioactive electrospun scaffolds delivering growth factors and genes for tissue engineering applications," *Pharm. Res.*, vol. 28, no. 6, pp. 1259–1272, 2011.
- [10] H. K. Makadia and S. J. Siegel, "Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier," *Polymers (Basel).*, vol. 3, no. 4, pp. 1377–1397, Aug. 2011.
- [11] K. Ladewig, "Drug delivery in soft tissue engineering," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 8, no. 9, pp. 1175–1188, Sep. 2011.
- [12] P. F. Pagbe Ndobo, "Ingénierie tissulaire et régénération parodontale," Université de Nantes, 2012.
- [13] E. Ruoslahti and M. D. Pierschbacher, "New Perspectives in Cell Adhesion : RGD and Integrins," Science (80-. )., vol. 238, no. 4826, pp. 491–497, 1987.
- [14] L. L. Hench, "Bioceramics: from concept to clinic," J. Am. Ceram. Soc., vol. 74, no. 7, pp. 1487– 510, 1991.
- [15] V. Vogel and M. Sheetz, "Local force and geometry sensing regulate cell functions.," Nat. Rev. Mol. Cell Biol., vol. 7, no. 4, pp. 265–75, 2006.
- [16] G. Forgacs and W. Sun, *Biofabrication: micro- and nano-fabrication, printing, patterning and assemblies*. Amsterdam: Elsevier Science, 2013.
- [17] V. Viateau *et al.*, "Comparative study of the osteogenic ability of four different ceramic constructs in an ectopic large animal model: Comparative osteogenic ability of four different ceramic constructs in an ectopic large animal model," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 10, no. 3, pp. E177–E187, Mar. 2016.

- [18] L. S. Nair and C. T. Laurencin, "Biodegradable polymers as biomaterials," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, no. 8–9, pp. 762–798, 2007.
- [19] J. Bergsma, "Late degradation tissue response to poly(?-lactide) bone plates and screws," *Biomaterials*, vol. 16, no. 1, pp. 25–31, 1995.
- [20] P. B. Maurus and C. C. Kaeding, "Bioabsorbable implant material review," *Oper. Tech. Sports Med.*, vol. 12, no. 3, pp. 158–160, 2004.
- [21] G. Hinrichsen, Biomedical polymers, designed-to-degrade systems, no. 5. 1995.
- [22] H. Sun, L. Mei, C. Song, X. Cui, and P. Wang, "The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant," *Biomaterials*, vol. 27, no. 9, pp. 1735–1740, 2006.
- [23] R. A. Miller, J. M. Brady, and D. E. Cutright, "Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): Rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios," J. Biomed. Mater. Res., vol. 11, no. 5, pp. 711–719, 1977.
- [24] D. D. Frazier, V. K. Lathi, T. N. Gerhart, and W. C. Hayes, "Ex vivo degradation of a poly(propylene glycol-fumarate) biodegradable particulate composite bone cement," J. Biomed. Mater. Res., vol. 35, no. 3, pp. 383–389, Jun. 1997.
- [25] J. S. Temenoff and A. G. Mikos, "Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 21, no. 23, pp. 2405–2412, 2000.
- [26] R. A. Perez and G. Mestres, "Role of pore size and morphology in musculo-skeletal tissue regeneration," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 61, pp. 922–939, 2016.
- [27] J. Rouquerol *et al.*, "Recommendations for the characterization of porous solids," *Pure Appl. Chem.*, vol. 66, no. 8, pp. 1739–1758, 1994.
- [28] S. J. Lee, J. S. Choi, K. S. Park, G. Khang, Y. M. Lee, and H. B. Lee, "Response of MG63 osteoblastlike cells onto polycarbonate membrane surfaces with different micropore sizes," *Biomaterials*, vol. 25, no. 19, pp. 4699–4707, 2004.
- [29] J. W. Lee, G. Ahn, J. Y. Kim, and D.-W. Cho, "Evaluating cell proliferation based on internal pore size and 3D scaffold architecture fabricated using solid freeform fabrication technology," J. Mater. Sci. Mater. Med., vol. 21, no. 12, pp. 3195–3205, Dec. 2010.
- [30] Z.-Z. Zhang *et al.*, "Role of scaffold mean pore size in meniscus regeneration," *Acta Biomater.*, vol. 43, pp. 314–326, Oct. 2016.
- [31] P. Yilgor, R. A. Sousa, R. L. Reis, N. Hasirci, and V. Hasirci, "3D plotted PCL scaffolds for stem cell based bone tissue engineering," *Macromol. Symp.*, vol. 269, no. 1, pp. 92–99, 2008.
- [32] R. Akbarzadeh and A.-M. Yousefi, "Effects of processing parameters in thermally induced phase separation technique on porous architecture of scaffolds for bone tissue engineering: Thermally Induced Phase Separation Technique," J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater., vol. 102, no. 6, pp. 1304–1315, Aug. 2014.
- [33] C. Ji, N. Annabi, M. Hosseinkhani, S. Sivaloganathan, and F. Dehghani, "Fabrication of poly-DLlactide/polyethylene glycol scaffolds using the gas foaming technique," Acta Biomater., vol. 8, no. 2, pp. 570–578, Feb. 2012.
- [34] J. Reignier and M. A. Huneault, "Preparation of interconnected poly(ε-caprolactone) porous scaffolds by a combination of polymer and salt particulate leaching," *Polymer.*, vol. 47, no. 13, pp. 4703–4717, 2006.
- [35] S. Agarwal, J. H. Wendorff, and A. Greiner, "Use of electrospinning technique for biomedical

applications," Polymer., vol. 49, no. 26, pp. 5603–5621, 2008.

- [36] J. Reignier and M. A. Huneault, "Preparation of interconnected poly(ε-caprolactone) porous scaffolds by a combination of polymer and salt particulate leaching," *Polymer.*, vol. 47, no. 13, pp. 4703–4717, 2006.
- [37] I. Gibson, D. Rosen, and B. Stucker, *Additive manufacturing technologies: 3D printing, rapid prototyping and direct digital manufacturing*, Second Edi. New York Heidelberg Dodrecht London: Springer, 2015.
- [38] M. Vaezi, H. Seitz, and S. Yang, "A review on 3D micro-additive manufacturing technologies," *Int. J. Adv. Manuf. Technol.*, vol. 67, no. 5–8, pp. 1721–1754, 2013.
- [39] "Understanding Additive Manufacturing Ciklum." [Online]. Available: https://www.ciklum.com/blog/understanding-additive-manufacturing/. [Accessed: 16-Jan-2017].
- [40] M. T. Raimondi *et al.*, "Three-dimensional structural niches engineered via two-photon laser polymerization promote stem cell homing," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 1, pp. 4579–4584, 2013.
- [41] Zongsons Gan; Yaoyu Cao; Richard A. Evans; Min Gu, "Three-dimensional deep sub-diffraction optical beam lithography with 9 nm feature size," *Nat. Commun.*, vol. 4, p. 2061, 2013.
- [42] X. Huang, X. Wang, and Y. Zhao, "Study on a series of water-soluble photoinitiators for fabrication of 3D hydrogels by two-photon polymerization," *Dye. Pigment.*, vol. 141, pp. 413– 419, 2017.
- [43] L. Bourdon, J. C. Maurin, K. Gritsch, A. Brioude, and V. Salles, "Improvements in Resolution of Additive Manufacturing: Advances in Two-Photon Polymerization and Direct-Writing Electrospinning Techniques," ACS Biomater. Sci. Eng., vol. 4, no. 12, pp. 3927–3938, 2018.
- [44] K. M. Yun, C. J. Hogan, Y. Matsubayashi, M. Kawabe, F. Iskandar, and K. Okuyama, "Nanoparticle filtration by electrospun polymer fibers," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 62, no. 17, pp. 4751–4759, 2007.
- [45] R. Kessick and G. Tepper, "Electrospun polymer composite fiber arrays for the detection and identification of volatile organic compounds," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 117, no. 1, pp. 205–210, 2006.
- [46] X. Wang *et al.*, "Highly Sensitive Optical Sensors Using Electrospun Polymeric Nanofibrous Membranes," *MRS Proc.*, vol. 708, no. 3, p. BB10.44, Jan. 2001.
- [47] W. Gilbert, P. F. Mottelay, and E. Wright, *On the loadstone and magnetic bodies and on the great magnet the earth*. New York, J. Wiley & sons, 1893.
- [48] C. V. Boys, "On the Production, Properties, and some suggested Uses of the Finest Threads," *Proc. Phys. Soc. London*, vol. 9, no. 1, p. 8, 1887.
- [49] C. John F, "Electrical method of dispersing fluids.," US Patent 745276, 1903.
- [50] C. John F, "Apparatus for electrically dispersing fluids.," US Patent 692631, 1902.
- [51] M. William James, "Method of dispersing fluids.," US Patent 705691, 1902.
- [52] J. Zeleny, "The electrical discharge from liquid points, and a hydrostatic method of measuring the electric intensity at their surfaces," *Phys. Rev.*, vol. 3, no. 2, pp. 69–91, 1914.
- [53] Tucker, "The History of the Science and Technology of Electrospinning from 1600 to 1995," vol.
  7, pp. 63–73, 2012.

- [54] A. Formhals, "Production of artificial fibers," US Patent 2077373.
- [55] A. Formhals, "Method and apparatus for the production of fibers," US Patent 2116942, 1938.
- [56] "Method of and apparatus for producing fibrous or filamentary material."
- [57] G. Taylor, "Disintegration of Water Drops in an Electric Field," *Proc. R. Soc. London A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 280, no. 1382, pp. 383–397, Jul. 1964.
- [58] J. Doshi and D. H. Reneker, "Electrospinning process and applications of electrospun fibers," *J. Electrostat.*, vol. 35, no. 2–3, pp. 151–160, Aug. 1995.
- [59] K. S. Athira, P. Sanpui, and K. Chatterjee, "Fabrication of Poly(Caprolactone) Nanofibers by Electrospinning," *J. Polym. Biopolym. Phys. Chem.*, vol. 2, no. 4, pp. 62–66, 2014.
- [60] P. Gupta, C. Elkins, T. E. Long, and G. L. Wilkes, "Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent," *Polymer.*, vol. 46, no. 13, pp. 4799– 4810, Jun. 2005.
- [61] C. J. Thompson, G. G. Chase, A. L. Yarin, and D. H. Reneker, "Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model," *Polymer.*, vol. 48, no. 23, pp. 6913–6922, 2007.
- [62] J. Y. Zheng *et al.*, "The effect of surfactants on the diameter and morphology of electrospun ultrafine nanofiber," *J. Nanomater.*, vol. 2014, no. 689298, p. 9, 2014.
- [63] X. Zong, K. Kim, D. Fang, S. Ran, B. S. Hsiao, and B. Chu, "Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes," *Polymer.*, vol. 43, pp. 4403–4412, 2002.
- [64] J. S. Lee *et al.*, "Role of molecular weight of atactic poly(vinyl alcohol) (PVA) in the structure and properties of PVA nanofabric prepared by electrospinning," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 93, no. 4, pp. 1638–1646, 2004.
- [65] R. Ghelich, M. K. Rad, and A. A. Youzbashi, "Study on Morphology and Size Distribution of Electrospun NiO-GDC Composite Nanofibers Effect of Polymer Concentration Solution," J. Eng. Fiber. Fabr., vol. 10, no. 1, pp. 12–19, 2015.
- [66] S. Bazgir, R. Damerchely, S. Zargham, A. S. Rashidi, and A. Tavakoli, "The Effect of Flow Rate on Morphology and Deposition Area of Electrospun Nylon 6 Nanofiber," J. Eng. Fiber. Fabr., vol. 7, no. 4, p. 155892501200700, 2018.
- [67] C. Mit-uppatham, M. Nithitanakul, and P. Supaphol, "Ultrafine Electrospun Polyamide-6 Fibers: Effect of Solution Conditions on Morphology and Average Fiber Diameter," *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 205, no. 17, pp. 2327–2338, Nov. 2004.
- [68] M. . Demir, I. Yilgor, E. Yilgor, and B. Erman, "Electrospinning of polyurethane fibers," *Polymer.*, vol. 43, no. 11, pp. 3303–3309, 2002.
- [69] S. Megelski, J. S. Stephens, A. D. Bruce Chase, and John F. Rabolt, "Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers," 2002.
- [70] G. Collins, J. Federici, Y. Imura, and L. H. Catalani, "Charge generation, charge transport, and residual charge in the electrospinning of polymers: A review of issues and complications," J. Appl. Phys., vol. 111, no. 4, 2012.
- [71] A. F. Spivak, Y. A. Dzenis, and D. H. Reneker, "Model of steady state jet in the electrospinning process," *Mech. Res. Commun.*, vol. 27, no. 1, pp. 37–42, 2000.

- [72] C. P. Carroll and Y. L. Joo, "Electrospinning of viscoelastic Boger fluids: Modeling and experiments," *Phys. Fluids*, vol. 18, no. 5, 2006.
- [73] D. H. Reneker, A. L. Yarin, H. Fong, and S. Koombhongse, "Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning," *J. Appl. Phys.*, vol. 87, no. 9 I, pp. 4531–4547, 2000.
- [74] A. L. Yarin, S. Koombhongse, and D. H. Reneker, "Bending instability in electrospinning of nanofibers," *J. Appl. Phys.*, vol. 89, no. 5, pp. 3018–3026, 2001.
- [75] I. Coluzza, M. Lauricella, G. Pontrelli, S. Succi, and D. Pisignano, "JETSPIN: A specific-purpose open-source software for simulations of nanofiber electrospinning," *Comput. Phys. Commun.*, vol. 197, pp. 227–238, 2015.
- [76] C. P. Carroll and Y. L. Joo, "Discretized modeling of electrically driven viscoelastic jets in the initial stage of electrospinning," *J. Appl. Phys.*, vol. 109, no. 9, 2011.
- [77] M. Šimko and D. Lukáš, "Mathematical modeling of a whipping instability of an electrically charged liquid jet," *Appl. Math. Model.*, vol. 40, pp. 9565–9583, 2015.
- [78] S. Chen, R. Li, X. Li, and J. Xie, "Electrospinning : An enabling nanotechnology platform for drug delivery and regenerative medicine," 2018.
- [79] S. Liao et al., "Simultaneous Delivery of Highly Diverse Bioactive Compounds from Blend Electrospun Fibers for Skin Wound Healing," *Bioconjug. Chem.*, vol. 26, no. 7, pp. 1348–1358, 2015.
- [80] N. Nikmaram *et al.*, "Emulsion-based systems for fabrication of electrospun nanofibers : food , pharmaceutical and biomedical applications," *RSC Adv.*, vol. 7, pp. 28951–28964, 2017.
- [81] J. Wang and M. Windbergs, "Controlled dual drug release by coaxial electrospun fibers Impact of the core fluid on drug encapsulation and release," Int. J. Pharm., vol. 556, no. August 2018, pp. 363–371, 2019.
- [82] H. Jiang, Y. Hu, Y. Li, P. Zhao, K. Zhu, and W. Chen, "A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents," J. Control. Release, vol. 108, no. 2–3, pp. 237–243, 2005.
- [83] H. Chen, N. Wang, J. Di, Y. Zhao, Y. Song, and L. Jiang, "Nanowire-in-Microtube Structured Core/Shell Fibers via Multifluidic Coaxial Electrospinning," *Langmuir*, vol. 26, no. 13, pp. 11291– 11296, Jul. 2010.
- [84] F. Li, Y. Zhao, and Y. Song, "Core-Shell Nanofibers : Nano Channel and Capsule by Coaxial Electrospinning," in *Nanofibers*, no. February, InTech, 2010, p. 438.
- [85] J. Ning, M. Yang, H. Yang, and Z. Xu, "Tailoring the morphologies of PVDF nanofibers by interfacial diffusion during coaxial electrospinning," *Mater. Des.*, vol. 109, pp. 264–269, 2016.
- [86] L. Zhang, Y. Gao, H. Fong, Z.-T. Zhu, and Y. Liao, "Preparation, characterization, and encapsulation/release studies of a composite nanofiber mat electrospun from an emulsion containing poly(lactic-co-glycolic acid)," *Polymer.*, vol. 49, no. 24, pp. 5294–5299, 2008.
- [87] H. Esfahani, R. Jose, and S. Ramakrishna, "Electrospun Ceramic Nanofiber Mats Today: Synthesis, Properties, and Applications," *Materials (Basel).*, vol. 10, no. 1238, 2017.
- [88] P. Gibson, H. Schreuder-Gibson, and D. Rivin, "Transport properties of porous membranes based on electrospun nanofibers," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 187, pp. 469–481, 2001.

- [89] M. M. Stevens and J. H. George, "Exploring and Engineering the Cell Surface Interface," *Science* (80-. )., vol. 310, no. 5751, 2005.
- [90] S.-Y. Gu, Q.-L. Wu, J. Ren, and G. J. Vancso, "Mechanical Properties of a Single Electrospun Fiber and Its Structures," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 26, no. 9, pp. 716–720, May 2005.
- [91] A. Theron, E. Zussman, and A. L. Yarin, "Electrostatic field-assisted alignment of electrospun nanofibres," *Nanotechnology*, vol. 12, no. 3, pp. 384–390, Sep. 2001.
- [92] C. Y. Xu, R. Inai, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, "Aligned biodegradable nanofibrous structure: A potential scaffold for blood vessel engineering," *Biomaterials*, vol. 25, no. 5, pp. 877–886, 2004.
- [93] K. Kim, K. Lee, M. Khil, Y. Ho, and H. Kim, "The effect of molecular weight and the linear velocity of drum surface on the properties of electrospun poly(ethylene terephthalate) nonwovens," *Fibers Polym.*, vol. 5, no. 2, pp. 122–127, 2004.
- [94] D. Li *et al.*, "Electrospinning Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays and Layer-by-Layer Stacked Films," *Adv. Mater.*, vol. 16, no. 4, pp. 361–366, 2004.
- [95] D. Sun, C. Chang, S. Li, and L. Lin, "Near-field electrospinning," Nano Lett., vol. 6, no. 4, pp. 839– 842, 2006.
- [96] C. Chang, K. Limkrailassiri, and L. Lin, "Continuous near-field electrospinning for large area deposition of orderly nanofiber patterns," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 93, no. 12, pp. 2–5, 2008.
- [97] T. D. Brown, P. D. Dalton, and D. W. Hutmacher, "Direct writing by way of melt electrospinning," *Adv. Mater.*, vol. 23, no. 47, pp. 5651–5657, 2011.
- [98] D. Shin, J. Kim, and J. Chang, "Experimental study on jet impact speed in near-field electrospinning for precise patterning of nanofiber," J. Manuf. Process., vol. 36, no. March, pp. 231–237, 2018.
- [99] Y. Wu, Z. Wang, J. Ying Hsi Fuh, Y. San Wong, W. Wang, and E. San Thian, "Direct E-jet printing of three-dimensional fibrous scaffold for tendon tissue engineering," J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater., vol. 105, no. 3, pp. 616–627, 2015.
- [100] J. He, P. Xia, and D. Li, "Development of melt electrohydrodynamic 3D printing for complex microscale poly (ε-caprolactone) scaffolds," *Biofabrication*, vol. 8, no. 3, pp. 1–11, 2016.
- [101] J. L. Li *et al.*, "Fabrication of three-dimensional porous scaffolds with controlled filament orientation and large pore size via an improved E-jetting technique," *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, vol. 102, no. 4, pp. 651–658, 2014.
- [102] G. Hochleitner *et al.*, "Additive manufacturing of scaffolds with sub-micron filaments via melt electrospinning writing.," *Biofabrication*, vol. 7, no. 3, p. 035002, 2015.
- [103] J. Sun, S. Vijayavenkataraman, and H. Liu, "An overview of scaffold design and fabrication technology for engineered knee meniscus," *Materials (Basel).*, vol. 10, no. 1, pp. 1–19, 2017.
- [104] J. Groll, P. D. Dalton, F. Chen, B. Amsden, C. Blum, and G. Hochleitner, "Melt electrowriting below the critical translation speed to fabricate crimped elastomer scaffolds with non-linear extension behaviour mimicking that of ligaments and tendons," *Acta Biomater.*, vol. 72, pp. 110–120, 2018.
- [105] J. Wang, H. Zheng, M. Chang, Z. Ahmad, and J. Li, "Preparation of active 3D film patches via aligned fiber electrohydrodynamic (EHD) printing," *Sci. Rep.*, vol. 7, p. 43924, 2017.
- [106] O. Bas et al., "Melt Electrospinning Writing of Highly Ordered Large Volume Scaffold

Architectures," Adv. Mater., vol. 30, no. 20, p. 1706570, 2018.

- [107] T. D. Brown, P. D. Dalton, and D. W. Hutmacher, "Melt Electrospinning Today: An Opportune Time for an Emerging Polymer Process," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 56, pp. 116–166, 2016.
- [108] M. Kim, H. S. Yun, and G. H. Kim, "Electric-field assisted 3D-fibrous bioceramic-based scaffolds for bone tissue regeneration: Fabrication, characterization, and in vitro cellular activities," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, 2017.
- [109] X. Qu, P. Xia, J. He, and D. Li, "Microscale electrohydrodynamic printing of biobimetic PCL/nHA composite scaffolds for bone tissue engineering," *Mater. Lett.*, vol. 185, pp. 554–557, 2016.
- [110] M. G. Yeo, J. H. Ha, H. J. Lee, and G. H. Kim, "Fabrication of hASCs-laden structures using extrusion-based cell printing supplemented with an electric field," *Acta Biomater.*, vol. 38, pp. 33–43, 2016.
- [111] Li Jinlan, "Biofabrication and characterization of meniscal scaffolds via electrohydrodynamic jet printing technique," National university of Singapore, 2014.
- [112] J. He, X. Zhao, J. Chang, and D. Li, "Microscale Electro-Hydrodynamic Cell Printing with High Viability," *Small*, vol. 13, no. 47, pp. 1–9, 2017.
- [113] J. Doshi and D. H. Reneker, "Electrospinning process and applications of electrospun fibers," J. Electrostat., vol. 35, pp. 151–160, 1995.
- [114] H. Fong, I. Chun, and D. H. Reneker, "Beaded nanofibers formed during electrospinning," *Polymer.*, vol. 40, no. 16, pp. 4585–4592, 1999.
- [115] K. L. Ou *et al.*, "Membranes of epitaxial-like packed, super aligned electrospun micron hollow poly(l-lactic acid) (PLLA) fibers," *Eur. Polym. J.*, vol. 47, no. 5, pp. 882–892, 2011.
- [116] Q. Zhou, M. Bao, H. Yuan, S. Zhao, W. Dong, and Y. Zhang, "Implication of stable jet length in electrospinning for collecting well-aligned ultrafine PLLA fibers," *Polymer.*, vol. 54, no. 25, pp. 6867–6876, 2013.
- [117] S. Korkut, D. A. Saville, and I. A. Aksay, "Enhanced stability of electrohydrodynamic jets through gas ionization," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 100, no. 3, pp. 1–4, 2008.
- [118] J. M. Anderson and M. S. Shive, "Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, pp. 72–82, 2012.
- [119] A. Cipitria, A. Skelton, T. R. Dargaville, P. D. Dalton, and D. W. Hutmacher, "Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds - A review," J. Mater. Chem., vol. 21, pp. 9419–9453, 2011.
- [120] M. Ortiz, D. De Kee, and P. J. Carreau, "Rheology of concentrated poly (ethylene oxide) solutions," J. Rheol. (N. Y. N. Y)., vol. 38, no. 519, 1994.
- [121] T. Annable, R. Buscall, R. Ettelaie, and D. Whittlestone, "The rheology of solutions of associating polymers: Comparison of experimental behavior with transient network theory," J. Rheol. (N. Y. N. Y)., vol. 37, no. 4, pp. 695–726, 1993.
- [122] S. Matsuoka and M. K. Cowman, "Equation of state for polymer solution," *Polymer.*, vol. 43, no. 12, pp. 3447–3453, 2002.
- [123] G. Grigorescu and W.-M. Kulicke, "Prediction of Viscoelastic Properties and Shear Stability of Polymers in Solution," Adv. Polym. Sci., vol. 152, pp. 1–40, 2000.
- [124] W. M. Kulicke and R. Haas, "Flow Behavior of Dilute Polyacrylamide Solutions through Porous

Media. 1. Influence of Chain Length, Concentration, and Thermodynamic Quality of the Solvent," *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, vol. 23, no. 3, pp. 308–315, 1984.

- [125] R. Haas and W. M. Kullcke, "Flow Behavior of Dilute Polyacrylamide Solutions through Porous Media. 2. Indirect Determination of Extremely High Molecular Weights and Some Aspects of Viscosity Decrease over Long Time Intervals," *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, vol. 23, no. 3, pp. 316– 319, 1984.
- [126] T. O. Kashmola and E. S. Kamil, "Structure Rheology of Polyethylene Oxide Solution," *Iraqi J. Chem. Pet. Eng.*, vol. 15, no. 1, pp. 23–32, 2014.
- [127] K. W. Ebagninin, A. Benchabane, and K. Bekkour, "Rheological characterization of poly(ethylene oxide) solutions of different molecular weights," J. Colloid Interface Sci., vol. 336, no. 1, pp. 360– 367, 2009.
- [128] R. Fulchiron, A. Michel, V. Verney, and J. C. Roustant, "Correlations between relaxation time spectrum and melt spinning behavior of polypropylene. II: Melt spinning simulation from relaxation time spectrum," *Polym. Eng. Sci.*, vol. 35, no. 6, pp. 518–527, 1995.
- [129] R. Fulchiron, A. Michel, V. Verney, and J. C. Roustant, "Correlations between relaxation time spectrum and melt spinning behavior of polypropylene. 1: Calculation of the relaxation spectrum as a log-normal distribution and influence of the molecular parameters," *Polym. Eng. Sci.*, vol. 35, no. 6, pp. 513–517, 1995.
- [130] M. G. McKee, G. L. Wilkes, R. H. Colby, and Timothy E. Long, "Correlations of Solution Rheology with Electrospun Fiber Formation of Linear and Branched Polyesters," *Macromolecules*, vol. 37, pp. 1760–1767, 2004.
- [131] J. H. Yu, S. V. Fridrikh, and G. C. Rutledge, "The role of elasticity in the formation of electrospun fibers," *Polymer.*, vol. 47, no. 13, pp. 4789–4797, 2006.
- [132] D. Gupta, M. Jassal, and A. K. Agrawal, "Atypical rheology and spinning behavior of poly(vinyl alcohol) in a nonaqueous solvent," *Polym. J.*, vol. 51, pp. 883–894, 2019.
- [133] S. Tripatanasuwan, Z. Zhong, and D. H. Reneker, "Effect of evaporation and solidification of the charged jet in electrospinning of poly(ethylene oxide) aqueous solution," *Polymer.*, vol. 48, no. 19, pp. 5742–5746, 2007.
- [134] T. Han, A. L. Yarin, and D. H. Reneker, "Viscoelastic electrospun jets: Initial stresses and elongational rheometry," *Polymer.*, vol. 49, no. 6, pp. 1651–1658, 2008.
- [135] Z. Gou and A. J. McHugh, "Two-dimensional modeling of dry spinning of polymer fibers," J. Nonnewton. Fluid Mech., vol. 118, no. 2–3, pp. 121–136, 2004.
- [136] B. M. Cho, Y. S. Nam, J. Y. Cheon, and W. H. Park, "Residual charge and filtration efficiency of polycarbonate fibrous membranes prepared by electrospinning," J. Appl. Polym. Sci., vol. 132, no. 1, pp. 1–7, 2014.
- [137] G. Barnes and R. Woodcock, "Liquid Rope-Coil Effect," Am. J. Phys., vol. 26, no. 4, pp. 205–209, 1958.
- [138] M. Habibi, Y. Rahmani, D. Bonn, and N. M. Ribe, "Buckling of liquid columns," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 104, no. 7, pp. 2–5, 2010.
- [139] P.-T. Brun, "Dynamique des filaments élastiques et visqueux," Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012.
- [140] P. D. Dalton, N. T. Joergensen, J. Groll, and M. Moeller, "Patterned melt electrospun substrates

for tissue engineering," Biomed. Mater., vol. 3, no. 3, 2008.

- [141] T. D. Brown, F. Edin, N. Detta, A. D. Skelton, D. W. Hutmacher, and P. D. Dalton, "Melt electrospinning of poly(ε-caprolactone) scaffolds: Phenomenological observations associated with collection and direct writing," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 45, pp. 698–708, 2015.
- [142] G. K. Kaufman and D. M. Gooding, "Electrets," Phys. Today, vol. 2, no. 3, pp. 8–13, 2014.
- [143] R. M. Nezarati, M. B. Eifert, and E. Cosgriff-Hernandez, "Effects of Humidity and Solution Viscosity on Electrospun Fiber Morphology," *Tissue Eng. Part C*, vol. 19, no. 10, pp. 810–819, 2013.
- [144] P. D. Dalton, "Melt electrowriting with additive manufacturing principles," *Curr. Opin. Biomed. Eng.*, vol. 2, pp. 49–57, 2017.
- [145] J. Zheng *et al.*, "Electrohydrodynamic Direct-Write Orderly Micro / Nanofibrous Structure on Flexible Insulating Substrate," *J. Nanomater.*, vol. 2014, pp. 1–7, 2014.
- [146] M. Van de Weert, W. E. Hennink, and W. Jiskoot, "Protein instability in poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles," *Pharm. Res.*, vol. 17, no. 10, pp. 1159–1167, 2000.
- [147] S. M. Kelly, T. J. Jess, and N. C. Price, "How to study proteins by circular dichroism," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1751, no. 2, pp. 119–139, 2005.
- [148] P. Wen, Y. Wen, M. H. Zong, R. J. Linhardt, and H. Wu, "Encapsulation of Bioactive Compound in Electrospun Fibers and Its Potential Application," J. Agric. Food Chem., vol. 65, no. 42, pp. 9161–9179, 2017.
- [149] W. Ji *et al.*, "Fibrous scaffolds loaded with protein prepared by blend or coaxial electrospinning," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 11, pp. 4199–4207, 2010.
- [150] S. Rawat, C. Raman Suri, and D. K. Sahoo, "Molecular mechanism of polyethylene glycol mediated stabilization of protein," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 392, no. 4, pp. 561– 566, 2010.
- [151] S. Rawat, P. Gupta, A. Kumar, P. Garg, C. R. Suri, and D. K. Sahoo, *Molecular mechanism of poly(vinyl alcohol) mediated prevention of aggregation and stabilization of insulin in nanoparticles*, vol. 12, no. 4. 2015.
- [152] R. Itri, W. Caetano, L. R. S. Barbosa, and M. S. Baptista, "Effect of urea on bovine serum albumin in aqueous and reverse micelle environments investigated by small angle X-ray scattering, fluorescence and circular dichroism," *Brazilian J. Phys.*, vol. 34, no. 1, pp. 58–63, 2004.
- [153] J. C. Lee and L. L. Y. Lee, "Preferential solvent interactions between proteins and polyethylene glycols.," *J. Biol. Chem.*, vol. 256, no. 2, pp. 625–631, 1981.
- [154] S. Rawat, N. Kohli, C. R. Suri, and D. K. Sahoo, "Molecular mechanism of improved structural integrity of protein in polymer based microsphere delivery system," *Mol. Pharm.*, vol. 9, no. 9, pp. 2403–2414, 2012.
- [155] H. Jiang, D. Fang, B. S. Hsiao, B. Chu, and W. Chen, "Optimization and characterization of dextran membranes prepared by electrospinning," *Biomacromolecules*, vol. 5, no. 2, pp. 326– 333, 2004.
- [156] S. Sahoo, L. T. Ang, J. C. H. Goh, and S. L. Toh, "Growth factor delivery through electrospun nanofibers in scaffolds for tissue engineering applications," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 93, no. 4, pp. 1539–1550, 2010.
- [157] C. Tang, A. E. Ozcam, B. Stout, and S. A. Khan, "Effect of pH on protein distribution in
electrospun PVA/BSA composite nanofibers," *Biomacromolecules*, vol. 13, no. 5, pp. 1269–1278, 2012.

- [158] X. Wang, Y. Yuan, X. Huang, and T. Yue, "Controlled release of protein from core-shell nanofibers prepared by emulsion electrospinning based on green chemical," J. Appl. Polym. Sci., vol. 132, no. 16, pp. 1–9, 2015.
- [159] P. Samanta *et al.*, "Crystallization behaviour of poly(ethylene oxide) under confinement in the electrospun nanofibers of polystyrene/poly(ethylene oxide) blends," *Soft Matter*, vol. 12, no. 23, pp. 5110–5120, 2016.
- [160] J. Wang and M. Windbergs, "Influence of polymer composition and drug loading procedure on dual drug release from PLGA:PEG electrospun fibers," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 124, no. May, pp. 71–79, 2018.
- [161] N. Kamaly, B. Yameen, J. Wu, and O. C. Farokhzad, "Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: Mechanisms of controlling drug release," *Chem. Rev.*, vol. 116, no. 4, pp. 2602–2663, 2016.
- [162] S. K. Tiwari and S. Venkatraman, "Electrospinning pure protein solutions in core-shell fibers," Polym. Int., vol. 61, no. 10, pp. 1549–1555, 2012.
- [163] S. N. Timasheff, "Protein-Solvent Interactions and Protein Conformation," Acc. Chem. Res., vol. 3, no. 2, pp. 62–68, 1970.
- [164] Y. Moriyama, K. A. I, K. Takeda, A. Wada, and K. Yamamoto, "Conformational Change of Bovine Serum Albumin by Heat Treatment," J. Protein Chem., vol. 8, no. 5, pp. 653–659, 1989.
- [165] A. A. Palakkan, J. Nanda, and J. A. Ross, "Pluripotent stem cells to hepatocytes, the journey so far," *Biomed. Reports*, vol. 6, no. 4, pp. 367–373, 2017.
- [166] K. Si-Tayeb *et al.,* "Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells," *Hepatology*, vol. 51, no. 1, pp. 297–305, 2010.
- [167] Y. I. Tsukada, K. Miyazawa, and N. Kitamura, "High Intensity ERK Signal Mediates Hepatocyte Growth Factor-induced Proliferation Inhibition of the Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG2," J. Biol. Chem., vol. 276, no. 44, pp. 40968–40976, 2001.
- [168] S. L. Organ and M. Tsao, "An overview of the c-MET signaling pathway," Ther. Adv. Med. Oncol., vol. 1, pp. 7–19, 2011.
- [169] E. Shirako, N. Hirayama, Y. I. Tsukada, T. Tanaka, and N. Kitamura, "Up-regulation of p21CIP1 expression mediated by ERK-dependent and -independent pathways contributes to hepatocyte growth factor-induced inhibition of HepG2 hepatoma cell proliferation," J. Cell. Biochem., vol. 104, no. 1, pp. 176–188, 2008.
- [170] Z. Dai, J. Ronholm, Y. Tian, B. Sethi, and X. Cao, "Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications," *J. Tissue Eng.*, vol. 7, pp. 1–13, 2016.
- [171] K. Ushio, T. Hashimoto, N. Kitamura, and T. Tanaka, "Id1 is down-regulated by hepatocyte growth factor via ERK-dependent and ERK-independent signaling pathways, leading to increased expression of p16 INK4a in hepatoma cells," *Mol. Cancer Res.*, vol. 7, no. 7, pp. 1179– 1188, 2009.
- [172] E. Passegué and E. F. Wagner, "JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16 INK4a expression," EMBO J., vol. 19, no. 12, pp. 2969–2979, 2000.
- [173] Y. Tsukada, T. Tanaka, K. Miyazawa, and N. Kitamura, "Involvement of Down-Regulation of Cdk2

Activity in Hepatocyte Growth Factor – Induced Cell Cycle Arrest at G1 in the Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG2," J. Biochem., vol. 136, pp. 701–709, 2004.

- [174] T. B. Bini, S. Gao, S. Wang, and S. Ramakrishna, "Poly(I-lactide-co-glycolide) biodegradable microfibers and electrospun nanofibers for nerve tissue engineering: An in vitro study," J. Mater. Sci., vol. 41, no. 19, pp. 6453–6459, 2006.
- [175] U. D. Bret, N. S. Lakshmi, and C. T. Laurencin, "Biomedical Applications of Biodegradable Polymers," *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 3, no. 49, pp. 832–864, 2011.
- [176] U. Hersel, C. Dahmen, and H. Kessler, "RGD modified polymers: Biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond," *Biomaterials*, vol. 24, no. 24, pp. 4385–4415, 2003.
- [177] C. Fischbach *et al.*, "Does UV irradiation affect polymer properties relevant to tissue engineering?," *Surf. Sci.*, vol. 491, no. 3, pp. 333–345, 2001.
- [178] D. I. Braghirolli *et al.*, "The effect of sterilization methods on electronspun poly(lactide-coglycolide) and subsequent adhesion efficiency of mesenchymal stem cells," *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, vol. 102, no. 4, pp. 700–708, 2014.
- [179] H. Yang, N. Magilnick, M. Noureddin, J. M. Mato, and S. C. L, "Effect of Hepatocyte Growth Factor on Methionine Adenosyltransferase Genes and Growth is Cell Density-Dependant in HepG2 Cells," J. Cell. Physiol., vol. 210, pp. 766–773, 2007.
- [180] I. Tajima and R. August, "Hepotacyte growth factor has potent anti-proliferative activity in various tumor cell lines," *Fed. Eur. Biochem. Soc.*, vol. 291, no. 2, pp. 229–232, 1991.
- [181] A. Kondo, N. Hirayama, Y. Sugito, M. Shono, T. Tanaka, and N. Kitamura, "Coupling of Grb2 to Gab1 mediates hepatocyte growth factor-induced high intensity ERK signal required for inhibition of HepG2 hepatoma cell proliferation," J. Biol. Chem., vol. 283, no. 3, pp. 1428–1436, 2008.
- [182] H. S. Lee *et al.*, "Hepatocyte growth factor stimulates the growth and activates mitogenactivated protein kinase in human hepatoma cells," *J. Biomed. Sci.*, vol. 5, no. 3, pp. 180–184, 1998.
- [183] Y. Jiang, W. Xu, J. Lu, F. He, and X. Yang, "Invasiveness of hepatocellular carcinoma cell lines: Contribution of hepatocyte growth factor, c-met, and transcription factor Ets-1," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 286, no. 5, pp. 1123–1130, 2001.
- [184] S. Y. Wang *et al.*, "SU5416 is a potent inhibitor of hepatocyte growth factor receptor (c-Met) and blocks HGF-induced invasiveness of human HepG2 hepatoma cells," *J. Hepatol.*, vol. 41, no. 2, pp. 267–273, 2004.
- [185] W. J. Lee, L. F. Wu, W. K. Chen, C. J. Wang, and T. H. Tseng, "Inhibitory effect of luteolin on hepatocyte growth factor/scatter factor-induced HepG2 cell invasion involving both MAPK/ERKs and PI3K-Akt pathways," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 160, no. 2, pp. 123–133, 2006.
- [186] S. E. Noriega, G. I. Hasanova, M. J. Schneider, G. F. Larsen, and A. Subramanian, "Effect of fiber diameter on the spreading, proliferation and differentiation of chondrocytes on electrospun chitosan matrices," *Cells Tissues Organs*, vol. 195, no. 3, pp. 207–221, 2012.
- [187] A. C. Bean and R. S. Tuan, "Fiber diameter and seeding density influence chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells seeded on electrospun poly(ε-caprolactone) scaffolds," *Biomed. Mater.*, vol. 10, p. 015018, 2015.
- [188] M. Ahmed, T. Ramos, P. Wieringa, C. Van Blitterswijk, J. De Boer, and L. Moroni, "Geometric constraints of endothelial cell migration on electrospun fibres," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–10,

2018.

- [189] D. Schuppan *et al.*, "Collagens in the liver extracellular matrix bind hepatocyte growth factor," *Gastroenterology*, vol. 114, no. 1, pp. 139–152, 1998.
- [190] X. Q. Liu *et al.*, "Biomaterial-enabled delivery of SDF-1α at the ventral side of breast cancer cells reveals a crosstalk between cell receptors to promote the invasive phenotype," *Biomaterials*, vol. 127, pp. 61–74, 2017.
- [191] D. Bourgeois, P. Bouchard, and C. Mattout, "Epidemiology of periodontal status in dentate adults in France, 2002-2003," *J. Periodontal Res.*, vol. 42, no. 3, pp. 219–227, Jun. 2007.
- [192] X. Y. Xu, X. Li, J. Wang, X. T. He, H. H. Sun, and F. M. Chen, "Concise Review: Periodontal Tissue Regeneration Using Stem Cells: Strategies and Translational Considerations," *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 8, no. 4, pp. 392–403, 2019.
- [193] M. Aimetti, F. Ferrarotti, G. M. Mariani, and F. Romano, "A novel flapless approach versus minimally invasive surgery in periodontal regeneration with enamel matrix derivative proteins: a 24-month randomized controlled clinical trial," *Clin. Oral Investig.*, vol. 21, no. 1, pp. 327–337, 2017.
- [194] S. Sowmya *et al.*, "Tri-Layered Nanocomposite Hydrogel Scaffold for the Concurrent Regeneration of Cementum, Periodontal Ligament, and Alveolar Bone," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 6, no. 7, pp. 1–13, 2017.
- [195] H. Arzate, M. Zeichner-David, and G. Mercado-Celis, "Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration," *Peridontology* 2000, vol. 67, pp. 211–233, 2015.
- [196] S. H. Park *et al.*, "Effect of hydroxyapatite-coated nanofibrous membrane on the responses of human periodontal ligament fibroblast," *J. Ceram. Soc. Japan*, vol. 116, no. 1, pp. 31–35, 2008.
- [197] L. Mao *et al.*, "Effect of micro-nano-hybrid structured hydroxyapatite bioceramics on osteogenic and cementogenic differentiation of human periodontal ligament stem cell via Wnt signaling pathway," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 7031–7044, 2015.
- [198] M. Komaki, K. Iwasaki, H. Arzate, A. S. Narayanan, Y. Izumi, and I. Morita, "Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells," J. Cell. Physiol., vol. 227, no. 2, pp. 649–657, 2012.
- [199] S. K. Tiwari and S. S. Venkatraman, "Importance of viscosity parameters in electrospinning: Of monolithic and core-shell fibers," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 32, no. 5, pp. 1037–1042, 2012.
- [200] J. Yoon, H. S. Yang, B. S. Lee, and W. R. Yu, "Recent Progress in Coaxial Electrospinning: New Parameters, Various Structures, and Wide Applications," *Adv. Mater.*, vol. 30, no. 42, pp. 1–23, 2018.
- [201] N. Ristovski *et al.*, "Improved fabrication of melt electrospun tissue engineering scaffolds using direct writing and advanced electric field control," *Biointerphases*, vol. 10, no. 1, p. 011006, 2015.
- [202] Y. Tamada and Y. Ikada, "Cell adhesion to plasma-treated polymer surfaces," *Polymer.*, vol. 34, no. 10, pp. 2208–2212, 1993.
- [203] X. Wu *et al.*, "Electrospun fibrous scaffolds combined with nanoscale hydroxyapatite induce osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 9, no. 1, pp. 4135–4143, 2014.

- [204] S. An, Y. Gao, and J. Ling, "Characterization of human periodontal ligament cells cultured on three-dimensional biphasic calcium phosphate scaffolds in the presence and absence of Lascorbic acid, dexamethasone and β-glycerophosphate in vitro," *Exp. Ther. Med.*, vol. 10, no. 4, pp. 1387–1393, 2015.
- [205] N. Arceo, J. J. Sauk, J. Moehring, R. A. Foster, and M. J. Somerman, "Human Periodontal Cells Initiate Mineral-Like Nodules In Vitro," *J. Periodontol.*, vol. 62, no. 8, pp. 499–503, 1991.
- [206] P. Marie, "Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste," *Médecine/Sciences*, vol. 17, no. 12, pp. 1252–1259, 2001.
- [207] L. Hoz et al., "Cementum protein 1 (CEMP1) induces differentiation by human periodontal ligament cells under three-dimensional culture conditions," *Cell Biol. Int.*, vol. 36, no. 2, pp. 129–136, 2012.
- [208] X. Chen *et al.*, "Controlled release of recombinant human cementum protein 1 from electrospun multiphasic scaffold for cementum regeneration," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 11, pp. 3145–3158, 2016.
- [209] D. Torii, K. Konishi, N. Watanabe, S. Goto, and T. Tsutsui, "Cementogenic potential of multipotential mesenchymal stem cells purified from the human periodontal ligament," *Odontology*, vol. 103, no. 1, pp. 27–35, 2014.
- [210] J. Hu, Y. Zhou, L. Huang, J. Liu, and H. Lu, "Effect of nano-hydroxyapatite coating on the osteoinductivity of porous biphasic calcium phosphate ceramics," *BMC Musculoskelet. Disord.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–11, 2014.
- [211] H. Do Cha, J. M. Hong, T.-Y. Kang, J. W. Jung, D.-H. Ha, and D.-W. Cho, "Effects of micro-patterns in three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications," J. Micromechanics Microengineering, vol. 22, no. 12, p. 125002, 2012.
- [212] R. Grant, J. Hallett, S. Forbes, D. Hay, and A. Callanan, "Blended electrospinning with human liver extracellular matrix for engineering new hepatic microenvironments," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–12, 2019.
- [213] M. Kharaziha *et al.,* "Tough and flexible CNT-polymeric hybrid scaffolds for engineering cardiac constructs," *Biomaterials*, vol. 35, no. 26, pp. 7346–7354, 2014.
- [214] A. Abedi, M. Hasanzadeh, and L. Tayebi, "Conductive nanofibrous Chitosan/PEDOT:PSS tissue engineering scaffolds," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 237, p. 121882, 2019.
- [215] L. Liu, H. Bakhshi, S. Jiang, H. Schmalz, and S. Agarwal, "Composite Polymeric Membranes with Directionally Embedded Fibers for Controlled Dual Actuation," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 39, no. 10, pp. 1–7, 2018.
- [216] A. Zaky, A. Elbakry, A. Ehmer, M. Breunig, and A. Goepferich, "The mechanism of protein release from triglyceride microspheres," *J. Control. Release*, vol. 147, no. 2, pp. 202–210, Oct. 2010.
- [217] K. C. Scheiner *et al.*, "Sustained Release of Vascular Endothelial Growth Factor from Poly(εcaprolactone-PEG-ε-caprolactone)- *b* -Poly( <scp>I</scp> -lactide) Multiblock Copolymer Microspheres," ACS Omega, vol. 4, no. 7, pp. 11481–11492, 2019.
- [218] Yolanda Smith, "Protein Structure and Function," News Medical Life Science, 2018. [Online]. Available: https://www.news-medical.net/life-sciences/Protein-Structure-and-Function.aspx. [Accessed: 29-Aug-2019].