



HAL
open science

**Influence du greffage covalent de polymères bioactifs,
sous irradiations UV, sur des échafaudages en fibres
PCL électrofilées : Caractérisation de surface, étude des
propriétés mécaniques et évaluation de la réponse
biologique**

Gana Amokrane

► **To cite this version:**

Gana Amokrane. Influence du greffage covalent de polymères bioactifs, sous irradiations UV, sur des échafaudages en fibres PCL électrofilées : Caractérisation de surface, étude des propriétés mécaniques et évaluation de la réponse biologique. Biomécanique [physics.med-ph]. Université Paris-Nord - Paris XIII, 2019. Français. NNT : 2019PA131069 . tel-03218381

HAL Id: tel-03218381

<https://theses.hal.science/tel-03218381>

Submitted on 5 May 2021

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.



THESE / UNIVERSITE SORBONNE PARIS-CITE

Pour obtenir le titre de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE SORBONNE PARIS-CITE

Discipline : Sciences des matériaux

Spécialité : Biomatériaux

Présentée par :

Gana AMOKRANE

Dr en Médecine Dentaire

Préparée au LBPS

Unité de recherche CSPBAT UMR7244

UNIVERSITE PARIS XIII

**Influence du greffage covalent
de polymères bioactifs, sous
irradiations UV, sur des
échafaudages en fibres PCL
électrofilées : Caractérisation
de surface, étude des
propriétés mécaniques et
évaluation de la réponse
biologique**

Thèse soutenue le 11 Octobre 2019

Devant le jury composé de :

M. Thibault Lemaire

Pr. à l'Université Paris-Est Créteil / Rapporteur

M. Daniel Grande

Directeur de Recherche à l'Université Paris-Est Créteil /
Rapporteur

Mme Najet Yagoubi

Pr. à l'Université Paris-Sud / Présidente

Mme Véronique Migonney

Pr. à l'Université Paris XIII / Examinatrice

M. Humblot Vincent

Chargé de recherche à l'Université Pierre et Marie Curie
/ Examineur

M. Salah Ramtani

Pr. à l'Université Paris XIII / Directeur de thèse

Mme Falentin-Daudré Céline

MCF à l'Université Paris XIII / Co-Directrice de thèse

Laboratoire des Biomatériaux Pour la Santé
Unité de recherche CSPBAT UMR7244
Institut Galilée, Université Paris XIII, Sorbonne Paris-Cité

Thèse présentée par

Gana AMOKRANE

Dr en Médecine Dentaire

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE SORBONNE PARIS-CITE

Discipline : Sciences des matériaux

Spécialité : Biomatériaux

Influence du greffage covalent de polymères bioactifs, sous irradiations UV, sur des échafaudages en fibres PCL électrofilées : Caractérisation de surface, étude des propriétés mécaniques et évaluation de la réponse biologique

Soutenue le Vendredi 11 octobre 2019

Devant le jury composé :

Rapporteurs :

M. Thibault Lemaire : Pr. à l'Université Paris-Est Créteil

M. Daniel Grande : Directeur de Recherche à l'Université Paris-Est Créteil

Examineurs :

Mme Najet Yagoubi : Pr. à l'Université Paris-Sud

Mme Véronique Migonney : Pr. à l'Université Paris XIII

M. Humblot Vincent : Chargé de recherche à l'Université Pierre et Marie Curie

M. Salah Ramtani : Pr. à l'Université Paris XIII (Directeur de thèse)

Mme Falentin-Daudré Céline : MCF à l'Université Paris XIII (Co-Directrice de thèse)

*« If you want to live a happy life, tie
it to a goal, not to people or things »*

Albert Einstein

Remerciements

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Biomatériaux Pour la Santé LBPS au sein de l'unité de Chimie, Structures, Propriétés de Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques (CSPBAT, CNRS UMR 7244) à l'Institut Galilée, Université Paris XIII.

Une thèse est un travail collaboratif, spécialement dans le domaine des biomatériaux, nécessitant de collaborer en interdisciplinarité avec des personnes au savoir et au parcours aussi variés que différents. Je remercie toutes les personnes qui ont aidé, de près ou de loin, à réaliser cette thèse.

Je souhaite avant tout présenter toute ma gratitude à mes deux directeurs de thèse pour leur disponibilité, leurs conseils, leur patience à mon égard et pour m'avoir guidé et encouragé durant ces 3 années de travaux.

A commencer par le Pr. S. Ramtani, pour son professionnalisme, sa bienveillance, sa curiosité et ses très grandes compétences en Mécanique. Merci d'avoir manipulé avec moi et pour avoir su me remotiver à chaque fois. Ce fut un plaisir immense que de travailler avec lui. « *Dhargaz dh wawal !* ».

Je désire exprimer ma sincère reconnaissance au Dr. C. Falentin-Daudré, pour avoir codirigé cette thèse, pour sa jovialité constante et sa gentillesse. Elle a su m'encadrer en me donnant toute la liberté, afin de mener ce projet à bien en toute autonomie. Merci d'avoir gardé en toutes circonstances un œil critique sur mes travaux, et d'avoir répondu à chacune de mes sollicitations.

Je voudrais aussi remercier le Pr. V. Migonney, chef du LBPS, pour m'avoir accueilli dans ce laboratoire. Merci pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse et pour le temps qu'elle m'a consacré ainsi que pour ses conseils éclairés.

Je remercie le Pr. N. Yagoubi d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse, le Pr. T. Lemaire et le Dr. D. Grande pour l'honneur qu'ils me font en acceptant d'évaluer ce travail de recherche.

Je tiens à témoigner ma gratitude au Dr. V. Humblot pour toutes ses analyses XPS de grande qualité, ainsi que pour sa participation à ce jury de thèse en tant qu'examineur.

J'aimerais remercier chaleureusement le Dr. E. Jubeli et Pr. N. Yagoubi, pour m'avoir accueilli dans le laboratoire de « Matériaux et Santé » (EA 401) de l'Université Paris-Sud et de m'avoir permis de réaliser toute la partie « réponse cellulaire » avec eux.

Je souhaiterais adresser mes sincères remerciements et mon amitié au Dr. E. Jubeli, pour sa patience et pour le temps sacrifié à m'encadrer pour l'étude de la réponse cellulaire. Pour sa très grande disponibilité et ses conseils. Je le remercie tant pour son professionnalisme que pour ses valeurs. Ce fut une expérience très enrichissante et j'espère pouvoir à nouveau retravailler avec lui.

J'aimerais aussi remercier le Dr. V. Nicolas de la Plate-forme d'imagerie cellulaire – MIPSIT (Université Paris-Sud), pour son aide à la réalisation de l'imagerie par fluorescence.

Je remercie également les membres du LBPS notamment Danielle Geldwerth pour son soutien et sa bonne humeur, Emmanuela Pasquet Di Dio Busa pour nos échanges et son aide pour toute la partie administrative. Le Dr. J. S. Baumann et le Dr. A. Rangel pour leur aide durant ma thèse.

Je remercie les autres membres du CSPBAT, notamment le Pr. P. Savarin, le Pr. D. Lutomski, le Dr. G. Rohman, le Dr. S. Changotad... ainsi que tous mes collègues doctorants (Médéric, Hanane...) avec qui j'ai pu apprécier d'échanger sur nos expériences de thèses. Je remercie également mes collègues doctorants rencontrés à l'Université Paris XIII : Ayoub et Xavier, avec qui j'ai partagé de très bons moments et des discussions enrichissantes.

Je tiens à remercier mon ami et ancien collègue, le Dr. H. Chouirfa, qui m'a orienté au début de ma thèse. Il a continué à me soutenir tout au long de ma thèse et a été une oreille attentive à chaque fois qu'il le fallait.

Je souhaiterais aussi remercier tous les membres du laboratoire « Matériaux et Santé », je pense notamment à Abdallah, Afif, Katia, Nicole, Johanna, Mahrez, Omar et Sonia, pour l'ambiance du laboratoire et leur aide tout au long de cette période que j'ai partagé avec eux.

Je tiens à remercier toute ma famille, pour leur soutien infaillible et inconditionnel. Je remercie aussi tous mes amis ; Amine, Amrane, Many, Abdelhak, David, Farid, Makhoul, Chris, Eric, Nacer... ne changez pas, restez comme vous êtes.

Je vais finir mes remerciements, par la personne avec qui j'ai choisi de partager mon quotidien, ma femme Thiziri, qui m'a supporté durant toute la rédaction de la thèse. Sache que sans toi, il aurait été impossible d'en arriver là.

Liste des abréviations

3D : Tridimensionnel

μm : Micromètre

nm : Nanomètre

AC : Angle de contact

AH : Acide hyaluronique

BT : Bleu de toluidine

Cell : Cellulaire

CF : Chloroforme

Col : Collagène

CSMs : Cellule Souches Mésoenchymateuses

Đ : Indice de polydispersité

DCM : Dichlorométhane

dH_2O : Eau distillée

DMEM : Dulbecco's Modified Eagles's Medium

DMF : Diméthylformamide

ε : Déformation

E : Module d'élasticité

G : Greffé(e)

kVs : Kilovolt

kDA : Kilodalton

LBPS : Laboratoire de biomatériaux pour la santé

MEC : Matrice extracellulaire

MPa : Mégapascal

M_n : Masse molaire en nombre

M_w : Masse molaire en poids

NaCl : Chlorure de sodium

NaSS : Sodium styrène sulfonate ou styrène sulfonate de sodium

Oz : Ozoné(e)

PBS: Phosphate Buffered Solution

PCL: Poly(ϵ -caprolactone)

PDL : Cellules du ligament parodontal humaines

PEG : Poly(éthylène glycol)

PEO : Oxyde de polyéthylène

PET : Poly(éthylène téréphtalate)

PGA : Acide polyglycolique

PLA : Acide polylactique

PLGA : Acide poly(lactique-co-glycolique)

PLLA : Acide poly-L-lactique

PMMA : Polyméthacrylate de méthyle

PolyNaSS : Poly(styrène sulfonate de sodium)

PP : Polypropylène

PS : Polystyrène

PU : Polyuréthane

RGD : Séquence peptidique arginine/glycine/acide aspartique

ROG : Régénération osseuse guidée

RTG : Régénération tissulaire guidée

S : Contrainte

SF : Fibroïne de soie

t_1 : Temps de relaxation court

t_2 : Temps de relaxation long

T_m : Température de fusion

UV : UltraViolet

X_c : Taux de cristallinité

XPS : X-ray photoelectron spectroscopy

Table des matières :

Introduction générale

Chapitre I : Etude bibliographique	5
1.1 Electrospinning (électrofilage) :.....	6
1.1.1 Histoire de l'électrofilage :.....	6
1.1.2 Procédé d'électrofilage :.....	7
1.1.3 Polymères utilisés dans l'électrofilage :.....	8
1.1.3.1 Polymères naturels et synthétiques :.....	9
1.1.3.2 Copolymères :.....	10
1.2 Effets de divers paramètres sur le processus d'électrofilage.....	11
1.2.1 Paramètres de la solution :.....	11
1.2.1.1 Concentration :.....	11
1.2.1.2 Poids moléculaire :.....	12
1.2.1.3 Viscosité :.....	12
1.2.1.4 Tension superficielle :.....	14
1.2.1.5 Conductivité / densité de charge de surface :.....	14
1.2.2 Paramètres du processus d'électrofilage :.....	15
1.2.2.1 Tension (ou voltage) appliquée :.....	15
1.2.2.2 Débit de la solution / vitesse d'alimentation :.....	16
1.2.2.3 Types de collecteur :.....	16
1.2.2.4 Distance entre la pointe de l'aiguille et le collecteur :.....	17
1.2.2.5 Diamètre d'aiguille :.....	18
1.2.3 Paramètres ambiants :.....	18
1.3 Solvants utilisés pour l'électrofilage :.....	20
1.4 Applications biomédicales des fibres électrofilées :.....	23
1.4.1 Administration ou délivrance de médicaments :.....	23
1.4.2 Contrôle du comportement cellulaire :.....	25
1.4.2.1 Adhésion cellulaire :.....	25
1.4.2.2 Prolifération/expansion cellulaire :.....	26
1.4.2.3 Différenciation cellulaire :.....	27
1.4.2.4 Migration cellulaire :.....	28
1.4.3 Médecine régénérative :.....	30
1.4.3.1 Peau :.....	30
1.4.3.2 Tissu nerveux :.....	32
1.4.3.3 Tissu cardiaque :.....	34
1.4.3.4 Tissu cartilagineux :.....	36

1.4.3.5	Tissus tendineux / ligamentaires :	37
1.4.3.6	Tissu osseux :	38
1.4.4	Fibres électrofilées avec activité antibactérienne :	39
1.4.5	Couverture de stents ou endoprothèses :	40
1.4.6	Fibres électrofilées pour des applications dentaires :	41
1.4.6.1	Régénération du complexe pulpo-dentinaire :	41
1.4.6.2	Régénération tissulaire guidée pour le parodonte :	43
1.4.6.3	Prévention des caries :	44
1.4.6.4	Modification de résines composites :	45
1.4.6.5	Modification de surface d'implants :	45
1.5	Stratégies de modifications post-électrofilage des fibres électrofilées :	47
1.5.1	Méthodes physiques :	49
1.5.1.1	Le traitement au plasma :	49
1.5.1.2	Dépôt en phase vapeur par procédé physique :	49
1.5.1.3	Modification par traitement thermique :	50
1.5.1.4	Traitement aux ultrasons :	50
1.5.2	Méthodes chimiques :	50
1.5.2.1	Greffage :	51
1.5.2.1	Oxydation :	55
1.5.2.2	Hydrolyse :	55
1.5.2.1	Réticulation :	57
1.5.2.2	Aminolyse :	58
1.5.2.3	Traitement à l'acide :	59
1.5.2.4	Modifications basées sur les nanoparticules :	59
1.6	Approches développées dans ce travail de thèse :	60

Chapitre II : Matériels et Méthodes 67

2.1	Elaboration des surfaces :	68
2.1.1	Préparation des films en PCL :	68
2.1.2	Développement d'un dispositif d'électrofilage au sein du laboratoire LBPS :	69
2.2	Greffage de polymères bioactifs :	71
2.2.1	Recristallisation du Styrène Sulfonate de Sodium (NaSS):	71
2.2.2	Greffage avec activation de la surface :	72
2.2.2.1	Génération des fonctions (hydro)peroxydes à la surface du PCL :	72
2.2.2.2	Polymérisation du NaSS à la surface des échantillons PCL :	73
2.2.3	Greffage UV direct sans activation de la surface :	73
2.2.4	Physisorption de NaSS et polyNaSS à la surface de films PCL :	73
2.3	Caractérisation de surface :	74
2.3.1	Dosage de la densité de greffage au Bleu de Toluidine (BT):	74

2.3.2	Mesure de l'angle de contact :	75
2.3.3	Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier à Réflexion Totale Atténuée (ATR/FTIR) :	76
2.3.4	Microscopie électronique à balayage couplée à une analyse élémentaire (MEB-EDX) : ..	76
2.3.5	Spectroscopie photoélectrique par rayons X (XPS) :	76
2.4	Etude des propriétés intrinsèques du polymère PCL :	77
2.4.1	Calorimétrie différentielle à balayage (DSC) :	77
2.4.2	Chromatographie d'exclusion stérique (SEC) :	78
2.5	Etude des propriétés mécaniques des échafaudages :	79
2.5.1	Rappels de mécanique :	80
2.5.1.1	La déformation nominale :	80
2.5.1.2	La contrainte nominale (ou conventionnelle) :	80
2.5.1.3	Propriétés mécaniques :	80
2.5.1.4	La relaxation de contrainte :	80
2.5.1.5	Calcul des temps caractéristiques de relaxation :	81
2.5.2	Dispositif et caractérisation :	81
2.6	Etude de la réponse biologique :	84
2.6.1	Préparation des échafaudages pour les tests biologiques :	84
2.6.2	Lignée cellulaire :	84
2.6.3	Ensemencement des cellules :	85
2.6.4	Viabilité cellulaire :	85
2.6.5	Morphologie cellulaire :	87
2.6.5.1	Fixation des cellules sans déshydratation pour observation en MEB :	87
2.6.5.2	Marquage des cellules pour observation en microscopie à fluorescence :	87
2.6.6	Prolifération cellulaire :	88

Chapitre III : Mise au point du greffage de polymères bioactifs, sous irradiation UV, sur des surfaces PCL

3.1	Greffage de polyNaSS avec activation de la surface :	91
3.1.1	Greffage par voie thermique :	92
3.1.2	Greffage sous irradiations UV :	94
3.2	Greffage de polyNaSS, sous irradiation UV, sans activation de la surface :	99
3.3	Physiosorption et stabilité du greffage :	104
3.4	Conclusion :	106

Chapitre IV : Elaboration, fonctionnalisation et caractérisation d'échafaudages en fibres PCL électrofilées

4.1	Préparation des échafaudages en fibres PCL électrofilées :	111
4.1.1	Mise au point des conditions pour la déposition de fibres électrofilées :	111
4.1.2	Production des échafaudages en PCL électrofilée pour cette étude :	116

4.1.2.1	Conditions de déposition :	116
4.1.2.2	Morphologie des membranes de PCL électrofilée :	118
4.2	Fonctionnalisation sous irradiation UV d'échafaudages en fibres PCL électrofilées, par le greffage covalent d'un polymère bioactif (polyNaSS) :	122
4.2.1	Caractérisation du greffage sur membranes en fibres PCL électrofilées:	124
4.2.2	Etude de l'effet du processus de greffage sur les propriétés intrinsèques :	144
4.2.2.1	Calorimétrie différentielle à balayage (DSC) :	145
4.2.2.2	Chromatographie d'exclusion Stérique (CES) :	147
4.3	Etude des propriétés mécaniques des échafaudages :	152
4.3.1	Essais mécaniques :	156
4.3.1.1	Essai de traction monotone :	156
4.3.1.2	Essai de traction alternée avec cycles de charge-décharge :	167
4.3.1.3	Essai de relaxation.....	171
4.4	Etude de la dégradation ; évaluation des propriétés mécaniques :	177
4.4.1	Principe de dégradation des polyesters :	177
4.4.2	Facteurs influençant la dégradation :	178
4.4.2.1	Facteurs intrinsèques :	178
4.4.2.2	Facteurs extrinsèques :	179
4.4.3	Dégradation des échafaudages « μm » :	179
4.4.3.1	Protocole expérimental :	180
4.4.3.2	Evaluation des propriétés mécaniques :	181
4.5	Conclusion :	193

Chapitre V : Développement d'un échafaudage bicouche pour la régénération tissulaire/osseuse guidée du parodonte.....

5.1	Elaboration d'un échafaudage en fibres PCL électrofilées « bicouche » :	200
5.1.1	Déposition des échafaudages bicouche :	201
5.2	Etude des propriétés mécaniques des échafaudages bicouche :	204
5.2.1	Essais mécaniques :	204
5.2.1.1	Comportement en traction :	204
5.2.1.2	Etude de la relaxation :	208
5.3	Etude de la réponse biologique :	210
5.3.1	Evaluation de la cytotoxicité :	211
5.3.2	Adhésion, étalement et morphologie cellulaire :	212
5.3.2.1	Fixation des cellules sans déshydratation :	213
5.3.2.2	Marquage des cellules pour la microscopie à fluorescence :	219
5.3.3	Prolifération cellulaire :	224
5.3.4	Evaluation de la pénétration/infiltration cellulaire :	228
5.4	Conclusion :	232

Conclusion générale	234
Perspectives	237
Références bibliographiques	239

Tables des illustrations : Figures

Figure 1 : Représentation schématique du montage vertical d'un appareil d'électrofilage et le phénomène d'électrofilage.....	8
Figure 2 : Variation de la morphologie des fibres de PEO électrofilées avec la viscosité: (a - d) représentations schématiques et (e - h) micrographies au microscope électronique à balayage.....	13
Figure 3 : (a - c) Images numériques montrant la déformation en trois étapes de la gouttelette de polyvinylpyrrolidone sous l'effet du champ électrique. Les dessins (d - f) montrent le mécanisme de l'effet de charges sur les gouttelettes polymères.	16
Figure 4 : Images FE-SEM (Microscopie électronique à balayage à émission de champ) de fibres de polyméthacrylate de méthyle (PMMA) électrofilées avec des taux d'humidité différents: a) 15-25%, b) 26-40%, c) 41-55%, d) 56-70%, e) section transversale d'une fibre non poreuse, et (f) section transversale d'une fibre poreuse.	19
Figure 5 : Fibres électrofilées pour une libération contrôlée de médicaments.....	24
Figure 6 : Fibres électrofilées pour la migration cellulaire.....	29
Figure 7 : Plate-forme nanofibreuse avec réchauffeur flexible intégré, pour l'administration de médicaments à la demande, dans la croissance de peau pour la réparation des brûlures et des plaies.....	31
Figure 8 : Echafaudages en fibres électrofilées pour la régénération/réparation des nerfs.....	33
Figure 9 : Patch cardiaque hybride en fibre électrofilées avec électrode de libération de médicament pour la surveillance et la régulation des fonctions tissulaires.....	36
Figure 10 : Représentation schématique de l'utilisation d'échafaudages électrofilés pour l'ingénierie tissulaire de différents types de tissus buccaux et dentaires.....	41
Figure 11 : Catégorisation schématique des techniques de modification post-électrofilage des membranes électrofilées.....	48
Figure 12 : Micrographies MEB montrant la morphologie des fibres de PLLA électrofilées irradiées par UV (a) avant et (b) après traitement par ultrasons. Le processus de scission produit des fibres courtes individuelles.....	50
Figure 13 : Schéma illustrant le schéma de fonctionnalisation en tri-clicks d'une membrane électrofilée. Les images de fluorescence des membranes modifiées (a-c) sont la preuve d'une fonctionnalisation séquentielle réussie.....	54
Figure 14 : Illustration schématique de l'immobilisation biologiquement pertinente du Matrigel sur une membrane PCL modifiée.....	56
Figure 15 : Représentation schématique de la technique de « grafting from » ou greffage à partir de la surface par voie thermique.....	62
Figure 16 : Procédés de spin coating pour la production de films PCL.....	68
Figure 17 : Dispositif d'électrofilage développé au LBPS.....	70
Figure 18 : Molécule du Styrène Sulfonate de Sodium (NaSS).....	71
Figure 19 : Recristallisation du Styrène Sulfonate de Sodium (NaSS).....	71
Figure 20 : Représentation schématique de l'appareil d'ozonation utilisé pour l'activation de la surface PCL.....	72
Figure 21 : Molécule de Bleu de Toluidine.....	75
Figure 22 : Forme et dimensions des emporte pièces pour découper des éprouvettes haltères.....	82

Figure 23 : Montage expérimental des tests de tractions sur éprouvettes normalisées.....	83
Figure 24 : Procédé de greffage du polyNaSS sur une surface PCL. La surface est ozonée avec formation d'(hydro)peroxydes et la chaleur ou l'irradiation UV donnent des radicaux par clivage homolytique qui initie la polymérisation.....	92
Figure 25 : Greffage thermique 3 h avec activation de la surface par 20 et 10 min d'ozonation, à 0.7 M.....	93
Figure 26 : Etude cinétique du greffage par amorçage UV à 160 mW/cm ² avec 20 et 10 min d'ozonation à 0.7 M.....	95
Figure 27 : (a) Film PCL non greffé, (b) greffage UV 60 min - ozonation 20 min, (c) greffage UV 15 min - ozonation 20 min, (d) greffage UV 60 min - ozonation 10 min.....	96
Figure 28 : Spectres FTIR-ATR des films PCL greffés polyNaSS : de haut en bas ; (vert) greffé UV 60 min - Oz 20 min, (bleu marine) Greffé UV 15 min - Oz 20 min, (cyan) greffé UV 60 min - Oz 20 min, (noir) film PCL non greffé, (rouge) polyNaSS.....	97
Figure 29 : Mapping/distribution des éléments sur : (a) Film PCL greffé sous UV avec activation de surface (Oz 20 min), (b) Film PCL non greffé.....	99
Figure 30 : Etude cinétique du greffage UV « direct », à 0.7 M et à 0.32 M, à 160 mW/cm ² en fonction du temps.....	101
Figure 31 : (a) Greffage UV « direct » 45 min à 0.32 M, (b) Greffage UV « direct » 45 min à 0.7 M.....	102
Figure 32 : Spectre FTIR-ATR de films PCL greffés polyNaSS : de haut en bas ; (brun) greffé UV direct 45 min à 0.7 M, (orange) greffé UV direct 45 min à 0.32 M.....	102
Figure 33 : Mapping/distribution des éléments sur film PCL greffé par amorçage UV sans activation de la surface, à 0.32 M.....	103
Figure 34 : Quantité de NaSS et de polyNaSS physisorbée sur les films PCL en fonction du temps après 48 h de rinçage.....	104
Figure 35 : (à gauche) Quantité de NaSS et de polyNaSS physisorbée sur des films PCL en fonction du temps après rinçage pendant 48 h et 1 mois, (à droite) Etude de la stabilité du greffage thermique et sous UV de polyNaSS sur la surface de films PCL après rinçage de 1 mois.....	105
Figure 36 : Etude des paramètres d'électrofilage dans le cadre de la mise au point de conditions adéquates pour la déposition de fibres électrofilées.....	114
Figure 37 : Micrographies MEB de la membrane « µm » en fibres PCL électrofilées à différents grossissements et histogrammes de la distribution du diamètre des fibres.....	120
Figure 38 : Micrographies MEB de la membrane « nm » en fibres PCL électrofilées à différents grossissements et histogrammes de la distribution du diamètre des fibres.....	121
Figure 39 : Procédé de greffage du PolyNaSS à la surface d'échafaudage en fibre PCL électrofilées.....	123
Figure 40 : Taux de greffage de polyNaSS sur les 2 types d'échafaudages en fibres PCL électrofilées.....	125
Figure 41 : Angles de contact et images de gouttes d'eau sur des échafaudages en fibres PCL électrofilées greffés et non greffés.....	126
Figure 42 : Mapping/distribution des éléments sur : échafaudages non greffés [a) µm et b) nm], échantillons greffés UV 1 h - Oz 20 min [c) µm et d) nm], échantillons greffés UV direct 1 h [e) µm et f) nm].	129
Figure 43 : Spectres FTIR-ATR des surfaces des échafaudages « µm » en fibres PCL électrofilées non greffé et greffés polyNaSS : de haut en bas ; (orange) greffé UV direct 1 h, (violet) greffé UV 1 h - Oz 20 min, (bleu) greffé Th 3 h - Oz 20 min, (vert) greffé Th 1 h - Oz 20 min, (noir) non greffé, (rouge) polyNaSS.....	131
Figure 44 : Formule brute du PCL (gauche) et échafaudages en fibres PCL-polyNaSS (droite) avec les différents atomes de carbone et d'oxygène attribués en XPS.....	132

Figure 45 : Spectres généraux des échantillons d'échafaudages en fibres PCL non greffées, à gauche verre face + dos ; à droite plastique face + dos.	133
Figure 46 : Spectres XPS haute résolution des régions C1s (à gauche) et O1s (à droite) pour les échantillons suivants (de haut en bas) : a) éch 1 face, b) éch 1 dos, c) éch 4 face et d) éch 4 dos.	135
Figure 47 : Spectres XPS haute résolution des régions C1s (à gauche) et O1s (à droite) pour l'échantillon ozoné n° 8.	137
Figure 48 : Spectres généraux « survey » (gauche), spectres XPS haute résolution des régions C1s (milieu) et O1s (droite), de haut en bas ; a) éch 1 (non greffé), b) éch 8 (Oz 20 min), c) éch 15 (G Th 1 h – Oz 20 min), d) éch 20 (G Th 3 h – Oz 20 min), e) éch 27 (G UV 1 h - Oz 20 min) et f) éch 32 (G UV direct 1 h).	139
Figure 49 : Comparaison entre les valeurs XPS obtenues et celles obtenues par dosage colorimétrique au BT.	143
Figure 50: Thermographes DSC des échafaudages « μm » en fibres PCL traités ou non.	145
Figure 51 : Courbes SEC des échantillons ; a) Non traités, b) Ozonés 20 min et c) irradiés aux UV pendant 1h.	148
Figure 52 : Courbes SEC des échantillons traités à 45 °C pendant ; a) 1 h et b) 3 h.	149
Figure 53 : Courbes SEC des échantillons ozonés et ayant subis par la suite ; a) chaleur à 45 °C pendant 1 h, b) chaleur à 45 °C pendant 3 h et c) irradiation UV pendant 1h.	150
Figure 54 : Courbes contrainte-déformation de différentes classes de polymères.	152
Figure 55 : (droite) Découpe des éprouvettes sur une membrane en fibres PCL électrofilées et (gauche) éprouvettes type H3.	154
Figure 56 : Micrographies MEB de la section transversale des échafaudages : (droite) μm et (gauche) nm, pour la mesure de l'épaisseur.	155
Figure 57 : Comportement global en traction des deux membranes testées à 0.5 mm.s ⁻¹	158
Figure 58 : Comportement en traction des membranes « μm » non traitées en fonction de la vitesse d'étirement.	159
Figure 59 : Comportement en traction des membranes « nm » non traitées en fonction de la vitesse d'étirement.	159
Figure 60 : Eprouvette d'une membrane « μm » ; A) avant l'essai de traction et B) après l'essai de traction.	160
Figure 61 : Micrographies MEB, après un essai de traction, sur; (droite) membrane nm et (gauche) membrane μm	161
Figure 62 : Courbes contrainte-déformation, à 0.5 mm.s ⁻¹ , des éprouvettes traités/greffées et témoins : (en haut) Membrane μm et (en bas) Membrane nm.	162
Figure 63 : Variation des modules d'Young (E) sur les échantillons testés à 0.5 mm.s ⁻¹	164
Figure 64 : Variation des valeurs de déformation Max sur les échantillons testés à 0.5 mm.s ⁻¹	164
Figure 65 : Variation des valeurs de contrainte Max pour les échantillons testés à 0.5 mm.s ⁻¹	166
Figure 66 : Courbes force-déplacement et comparaison des hystérésis pour les éprouvettes des membranes « μm » et « nm ».	168
Figure 67 : Variation des modules d'Young des hystérésis en fonction de la déformation, pour la membrane « μm ».	169
Figure 68 : Variation des modules d'Young des hystérésis en fonction de la déformation, pour la membrane « nm ».	170
Figure 69 : Différence de relaxation des deux membranes testées.	173

Figure 70 : Exemple de courbe obtenue fittée avec MathCad : (rouge) expérimentale et (bleu) théorique.	173
Figure 71 : Influence du traitement sur la relaxation des éprouvettes des membranes « μm » (en haut) et « nm » (en bas).	174
Figure 72 : Evolution du module d'Young au cours de la dégradation des éprouvettes « μm » dans du dH_2O	183
Figure 73 : Variation de la contrainte Max au cours de la dégradation des éprouvettes « μm » dans du dH_2O	184
Figure 74 : Variation de la déformation Max au cours de la dégradation des éprouvettes « μm » dans du dH_2O	185
Figure 75 : Variation des propriétés mécaniques des éprouvettes « μm » témoins et greffées UV 1 h – Oz 20 min, au cours de la dégradation dans dH_2O , PBS et NaCl.	188
Figure 76 : Micrographies sous MEB des éprouvettes greffées UV 1 h – Oz 20 min lors du test de dégradation, dans différents milieux.	190
Figure 77 : Représentation schématique de l'échafaudage bicouche fonctionnalisé.	200
Figure 78 : Micrographies MEB de la section transversale d'un échafaudage en fibres PCL électrofilées bicouche.	202
Figure 79 : Courbes contrainte-déformation des membranes « μm » et « nm » comparées à la membrane bicouche, à $0.5 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$	205
Figure 80 : Coubes contrainte-déformation, à $0.5 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$, des éprouvettes traités/greffées et témoins de la membrane bicouche.	207
Figure 81 : Pourcentage de viabilité des cellules fibroblastes L929 lorsqu'elles sontensemencées pendant 2 jours sur des différents échafaudages greffés polyNaSS et non greffés.	211
Figure 82 : Micrographies MEB de fibroblastes L929 fixés et adhérents sur des échafaudages en fibre PCL non greffés et greffés polyNaSS prises à 2 jours et valeurs des angles de contact pour chaque condition.	214
Figure 83 : Micrographies MEB à différents grossissements des fibroblastes L929 fixées et étalées sur les échafaudages en fibre PCL non greffés et greffés polyNaSS prise à 4 jours, ainsi que les valeurs des angles de contact pour chaque condition.	215
Figure 84 : Micrographies MEB d'échafaudages « μm » greffés : (gauche) Th 1 h – Oz 20 min et (droite) UV direct 1 h. La flèche jaune montre une protrusion cytoplasmique et les flèches bleues montrent des cellules qui ont pénétré sur des plans profonds.	216
Figure 85 : Micrographies MEB à différents grossissements des fibroblastes L929 fixées et étalées sur les échafaudages en fibre PCL non greffés et greffés polyNaSS prise à 4 jours, ainsi que les valeurs des angles de contact pour chaque condition.	217
Figure 86 : Morphologie des fibroblastes L929 après 72 h d'incubation sur les échafaudages en fibres PCL électrofilées. Les images sont réalisées au microscope à fluorescence au grossissement x 20. Non greffés (a, f), G Th 1 h – Oz 20 min (b, g), G Th 3 h – Oz 20 min (c, h), G UV 1 h – Oz 20 min (d, i) et G UV direct 1 h (e, j).	221
Figure 87 : Comparaison de la longueur cellulaire en fonction de l'échafaudage et de la condition de greffage.	223
Figure 88 : Prolifération cellulaire des fibroblastes L929 sur des échafaudages greffés et non greffés, mesurée par essai MTT effectué à 2, 4 et 7 jours (les données sont basées sur des échantillons en trois exemplaires de chaque condition pris à chacune des 3 durée d'incubation).	225
Figure 89 : Représentation de la technique du « Z-stacking » en microscopie à fluorescence.	229

Figure 90 : Images, prises avec la technique « Z-stacking », de fibroblastes L929 après 72 h d'incubation sur l'échafaudage « μm » greffé UV direct 1 h. L'épaisseur de chaque coupe ou image est égale à 2 μm . La barre d'échelle représente 100 μm et peut être appliquée sur toutes les images. 230

Figure 91 : Images, prises avec la technique « Z-stacking », de fibroblastes L929 après 72 h d'incubation sur l'échafaudage « nm » greffé UV direct 1 h. L'épaisseur de chaque coupe ou image est égale à 2 μm . La barre d'échelle représente 100 μm et peut être appliquée sur toutes les images. 231

Tables des illustrations : Tableaux

Tableau 1 : Propriétés des différents solvants utilisés dans le procédé d'électrofilage	21
Tableau 2 : Taux de greffage sous irradiations UV et angle de contact des échantillons greffé avec activation de la surface.....	96
Tableau 3 : Caractéristiques des bandes d'adsorption du polyNaSS.....	98
Tableau 4 : Analyse du (%) atomique des éléments sur différents films PCL greffés polyNaSS sous UV avec activation de la surface par ozonation (Oz)	98
Tableau 5 : Analyse du (%) atomique des éléments sur deux films PCL greffés UV direct	103
Tableau 6 : Conditions de déposition pour la production des échafaudages en fibres PCL électrofilées ...	116
Tableau 7 : Paramètres de la technique de « grafting from » ; greffage thermique et sous UV	124
Tableau 8 : Pourcentages atomiques des éléments sur les différents échafaudages greffés polyNaSS et non greffés.....	127
Tableau 9 : Bandes d'adsorption caractéristiques du polyNaSS.....	130
Tableau 10 : Pourcentages atomiques pour les échantillons non greffés réalisés à partir d'une seringue en verre ou en plastique, analysés de face et de dos.....	134
Tableau 11 : Pourcentages atomiques élément par élément, contribution par contribution et contribution totale, pour les échantillons ; n° 1 (seringue verre, face et dos) et n° 4 (seringue plastique, face et dos)..	136
Tableau 12 : Pourcentages atomiques pour les échantillons non greffés ozonés (20 min) réalisés à partir d'une seringue en verre.	136
Tableau 13 : Pourcentages atomiques élément par élément, contribution par contribution et contribution totale, pour les échantillons non greffés ozonés 20 min, réalisés à partir d'une seringue en verre.	137
Tableau 14 : Numéro/série et conditions de greffage des différents échantillons analysés	138
Tableau 15 : Pourcentages atomiques pour les échantillons, réalisés à partir d'une seringue en verre, greffés avec du polyNaSS suivants les différentes conditions. *Sur la base de 2 motifs polyNaSS par PCL.	138
Tableau 16 : Pourcentages atomiques élément par élément, contributions et contribution totale pour les différents échafaudages en fibres PCL ; non greffés et greffés polyNaSS. * sur la base de 2 motifs polyNaSS par unité PCL.	141
Tableau 17 : Taux de greffage de PolyNaSS sur les échafaudages en fibres PCL pour les différentes conditions de greffage, obtenus par dosage colorimétrique au TB et par calcul XPS.	143
Tableau 18 : Propriétés thermiques des échafaudages en fibre PCL non traités et traités.....	146
Tableau 19 : Masses molaires moyennes en nombre (Mn) et indice de polydispersité (Đ) des échafaudages « µm » en fibres PCL avant et après différents traitements.....	147
Tableau 20 : Epaisseur des scaffolds utilisés pour les tests mécaniques.	155
Tableau 21 : Conditions de traitement/greffage des éprouvettes H3.....	156
Tableau 22 : Propriétés mécaniques en traction des membranes « µm » et « nm » non traitées.....	160
Tableau 23 : Données mécaniques obtenues à partir des courbes expérimentales des différents échantillons des membranes « µm » et « nm » à 0.5 mm.s ⁻¹	165
Tableau 24 : Temps de relaxation pour chaque membrane et chaque condition de traitement.	175

Tableau 25 : Propriétés mécaniques des éprouvettes « μm », greffées et témoin non traité, dégradées dans dH_2O à différents temps.....	182
Tableau 26 : Temps de relaxation pour les éprouvettes « μm » greffées et témoins en fonction du temps de dégradation, dans du dH_2O	186
Tableau 27 : Propriétés mécaniques des éprouvettes « μm » témoins et greffées UV 1 h – Oz 20 min, au cours de la dégradation dans dH_2O , PBS et NaCl 0.15 M.....	187
Tableau 28 : Temps de relaxation pour les éprouvettes « μm » témoins et greffées UV 1 h – Oz 20 min, au cours de la dégradation dans dH_2O , PBS et NaCl.	191
Tableau 29 : Avantages et inconvénients des membranes RTG/ROG résorbables et non résorbables.....	198
Tableau 30 : Données mécaniques obtenues à partir des courbes expérimentales des différents échantillons de la membrane bicouche à 0.5 mm.s^{-1}	207
Tableau 31 : Temps de relaxation de la membrane bicouche pour chaque condition de traitement.....	208
Tableau 32 : Valeurs de la longueur cellulaire en fonction de l'échafaudage et de la condition de greffage.	222

Introduction générale

Les fibres électrofilées représentent une importante division des biomatériaux en raison d'un large éventail d'applications dans le domaine biomédical. La production de fibres électrofilées a suscité l'intérêt d'innombrables chercheurs, surtout ces dernières années, grâce à des propriétés uniques caractérisant ces fibres électrofilées en vue d'applications biomédicales, comme par exemple, la disponibilité d'une très grande surface pour l'interaction cellulaire, l'absorption de protéines et la présentation de sites de liaison pour des récepteurs cellulaires, mais aussi, leur capacité à être utilisées comme support pour la délivrance contrôlée de molécules biologiques.

Pour fabriquer des fibres polymères, différentes techniques ont été utilisées. Nous pouvons citer la technique de séparation des phases, la synthèse de gabarits, l'auto-assemblage et l'électrofilage. Parmi ces techniques, l'électrofilage est un procédé qui est, incontestablement, la technique la plus ingénieuse et celle qui présente le meilleur rapport coût/efficacité. Cette technique peut être appliquée pour des polymères solubles ou fusibles seuls, ou des polymères modifiés avec différents procédés pour obtenir des propriétés améliorées. La capacité de l'électrofilage à produire des fibres lisses et continues en fait l'une des techniques les plus attrayantes.

Les membranes en fibres électrofilées présentent plusieurs caractéristiques uniques, notamment un rapport surface/volume élevé, une distribution intéressante des pores, une flexibilité dans les propriétés de surface et des performances mécaniques élevées. Cependant, les mauvaises caractéristiques de surface des fibres électrofilées seules, en général, limitent leur applicabilité dans les applications biomédicales. De ce fait, de nombreuses stratégies sont en cours de développement pour adapter les propriétés des fibres électrofilées et les personnaliser.

Les propriétés des fibres électrofilées telles que la morphologie, la porosité et la géométrie de la surface peuvent être adaptées ou fonctionnalisées, par exemple, avec des molécules bioactives pour des applications biomédicales bien précises. La modification de surface des fibres électrofilées se réfère à des processus qui permettent d'incorporer

différentes fonctionnalités afin d'améliorer la structure chimique et les propriétés des fibres vierges.

L'équipe du « Laboratoire de Biomatériaux Pour la Santé » (LBPS) dirigée par le Pr. V. Migonney s'est intéressée depuis plus d'une vingtaine d'années au greffage de polymères d'intérêt thérapeutique. Le LBPS a développé une technique unique de greffage par voie thermique ou par irradiations UV de polymères « bioactifs » porteurs de groupements sulfonates, carboxylates, hydroxyles et/ou phosphonates sur différentes surfaces polymères (le poly(téréphtalate d'éthylène) (PET), le poly(ϵ -caprolactone (PCL)) ou métalliques (titane, alliage de titane) ou céramiques. Ils ont montré que le greffage de ces polymères permettait d'améliorer la réponse cellulaire tout en évitant les infections bactériennes. Le LBPS continue à étudier et à travailler sur le greffage radicalaire de polymères bioactifs tel que le poly(styrène sulfonate de sodium) (polyNaSS) sur les surfaces prothétiques dans le but de comprendre, d'améliorer le processus et aussi d'élargir le champ d'application de cette technique à différents types de surface de biomatériaux.

Cette thèse décrit l'élaboration et la fabrication de membranes électrofilées à base de fibres poly(ϵ -caprolactone) (PCL), leur fonctionnalisation afin de développer des échafaudages biodégradables bioactifs pour des applications en ingénierie tissulaire et l'étude de la réponse biologique *in vitro*. Cette étude inclut aussi l'appréciation des propriétés mécaniques.

Les travaux présentés dans ce manuscrit sont divisés en 5 grands chapitres :

Le premier chapitre est dédié à l'état de l'art des applications des membranes en fibres électrofilées dans le domaine biomédical. La technique d'électrofilage ainsi que ses différentes applications y sont présentées.

Le deuxième chapitre regroupe les différents matériaux et méthodes utilisés tout au long de ce travail, avec notamment, la conception/développement et la mise en œuvre d'un appareil d'électrofilage « *fait maison* ».

Le troisième chapitre présente la technique de « *grafting from* » par amorçage UV, qui a été utilisée pour mettre au point le greffage covalent de polymères bioactifs sur des surfaces PCL. Suivi par le quatrième chapitre, qui lui, regroupe les différents travaux réalisés pour fonctionnaliser des membranes en fibres PCL électrofilées avec un polymère

bioactif (polyNaSS). La fabrication de différents échafaudages en fibres PCL électrofilées, leur fonctionnalisation avec du polyNaSS par « grafting from » ainsi que l'appréciation des propriétés mécaniques y sont détaillés.

Le cinquième chapitre, présente l'élaboration d'un échafaudage bicouche hybride pour des applications en RTG/ROG. Les résultats des études biologiques *in vitro* réalisées au laboratoire Matériaux et Santé en collaboration avec le Dr Emile Jubeli et le Pr Najet Yagoubi (réponse cellulaire de fibroblastes : cytotoxicité, adhésion, morphologie et prolifération), y sont présentés. Cette étude de la réponse biologique sur des échafaudages en fibres PCL électrofilées greffées de polyNaSS par « grafting from » (thermique et UV) montrent l'influence du polymère bioactif greffé.

Etude bibliographique

Dans ce chapitre, nous posons les bases nécessaires à la compréhension du travail qui a été réalisé et qui sera exposé dans les chapitres suivants. C'est une analyse exhaustive de l'état de l'art, organisée en cinq parties. La première partie présente la technique d'électrofilage de manière générale avec son histoire, l'étude du procédé ainsi que des différents polymères utilisés. La seconde partie traite des différents paramètres gouvernant le procédé d'électrofilage. Elle met en évidence le rôle de chaque paramètre ainsi que son influence sur le résultat final. La troisième partie passe en revue les différents solvants utilisés dans l'électrofilage, et met un accent sur l'importance du solvant choisi pour réaliser des fibres électrofilées. La quatrième partie, détaille les différentes applications des fibres électrofilées dans le domaine biomédical. Elle permet de saisir toute l'étendue du champ d'applications de cette technique et son évolution quasi permanente. Dans la cinquième partie, nous examinerons les différentes méthodes utilisées pour modifier ou fonctionnaliser ces fibres électrofilées par différents moyens et précise le choix de la démarche entreprise dans ce travail de thèse.

1.1 Electrospinning (électrofilage) :

1.1.1 Histoire de l'électrofilage :

L'électrofilage est une technique ancienne. Elle a été observée pour la première fois en 1897 par Rayleigh, étudiée en détail par Zeleny (1914) [1] sur l'électro-pulvérisation, et breveté par Formhals [2] en 1934. Le travail de Taylor (1969) [3] sur des jets actionnés électriquement a permis d'établir les bases des techniques d'électrospinning. Le terme «électrospinning» ou « électrofilage, dérivé de «spinning ou filage électrostatique», a été utilisé relativement récemment (vers 1994), mais son origine remonte à plus de 60 ans.

Depuis les années 1980 et surtout ces dernières années, l'électrospinning a gagné plus d'attention, probablement en raison d'une augmentation de l'intérêt pour le développement des nanotechnologies, puisque des fibres ultrafines ou des structures fibreuses réalisées à partir de divers polymères avec des diamètres pouvant descendre à moins d'un micromètre peuvent être facilement fabriqués grâce à cette technique.

L'Electrofilage, une technologie largement utilisée pour la formation de fibres qui utilise des forces électriques pour produire des fibres polymères, avec des diamètres allant de 2 nm à plusieurs micromètres, en utilisant des solutions de polymères naturels ou synthétiques, a connu une augmentation considérable de la recherche et de l'attention commerciale sur les dernières années [4-5]. Les fibres électrofilées ont été obtenues avec succès dans divers domaines, tels que la nanocatalyse, les échafaudages d'ingénierie tissulaire, vêtements de protection, filtration, application biomédicales et pharmaceutique, optique électronique, santé, biotechnologie, défense et sécurité, et ingénierie environnementale [6-12].

Les fibres filées offrent également plusieurs avantages, notamment un rapport surface/volume extrêmement élevé, une porosité ajustable, une malléabilité à se conformer à une grande variété de tailles et de formes et la capacité de contrôler la composition des fibres (propriétés et fonctionnalités) pour obtenir les résultats souhaités en fonction de celles-ci. Au cours de ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour exploiter cette technologie permettant de produire des fibres nano ou micrométriques, notamment pour la production d'échafaudages nanofibreux à partir d'une variété de polymères naturels et synthétiques pour l'ingénierie tissulaire [13] tels

que l'acide polylactique (PLA) [14], le polyuréthane (PU) [15], la fibroïne de soie (SF) [16-17], le collagène (Col) [18], l'acide hyaluronique (AH) [19], la cellulose [20] et le chitosan/collagène [21].

1.1.2 Procédé d'électrofilage :

L'électrofilage, est une approche unique utilisant des forces électrostatiques pour produire des fibres fines à partir de solutions de polymères ou de polymères fondues. Les fibres ainsi produites ont un diamètre très fin (du nanomètre au micromètre) et une surface plus grande que celles obtenues par les procédés de filage classiques. Une tension continue de l'ordre de plusieurs dizaines de kVs est nécessaire pour générer l'électrofilage. Diverses techniques telles que les précipitateurs électrostatiques et les pulvérisateurs de pesticides fonctionnent de la même manière que le procédé d'électrofilage, et ce procédé, principalement basé sur le principe que de fortes forces électriques répulsives mutuelles compensent les forces plus faibles de la tension superficielle dans le liquide polymère chargé [22]. Actuellement, il existe deux installations d'électrofilage standard ; verticale et horizontale. Avec l'expansion de cette technologie, plusieurs groupes de recherche ont mis au point des systèmes plus sophistiqués qui peuvent fabriquer des structures de fibres plus complexes d'une manière plus contrôlée et plus efficace [23-28]. L'électrofilage s'effectue à température ambiante dans des conditions atmosphériques.

La Figure 1 illustre le montage typique à la verticale d'un appareil d'électrofilage, montage que nous avons utilisé pour la mise au point de notre appareil d'électrofilage fait-maison. Fondamentalement, un système d'électrofilage se compose de trois composants principaux : une alimentation haute tension, une filière (p. ex., une aiguille métallique) et une plaque collectrice mise à la terre (habituellement un écran métallique, une plaque ou un mandrin rotatif) et utilise une source haute tension pour injecter une charge d'une certaine polarité dans une solution polymère ou un polymère fondu, qui est ensuite accélérée vers un collecteur à polarité opposée [29]. La plupart des polymères sont dissous dans certains solvants avant l'électrofilage, et lorsqu'ils sont complètement dissous, forment une solution de polymère. La solution polymère est ensuite introduite dans une seringue pour l'électrofilage.

Dans le procédé d'électrofilage, une solution de polymère maintenue par sa tension superficielle à l'extrémité de la pointe d'une aiguille est soumise à un champ électrique,

induisant une charge électrique à la surface du liquide à cause de ce champ électrique. Lorsque le champ électrique appliqué atteint une valeur critique ou seuil, les forces électriques répulsives surmontent les forces de tension superficielle. Finalement, un jet de la solution chargé est éjecté de la pointe du cône de Taylor et un fouettement instable et rapide du jet se produit dans l'espace entre la pointe de l'aiguille et le collecteur qui conduit à l'évaporation du solvant, laissant le polymère derrière [3,30]. Le jet n'est stable qu'à l'extrémité de la filière et l'instabilité commence à partir de là. Ainsi, le procédé d'électrofilage offre une technique simplifiée pour la formation des fibres.

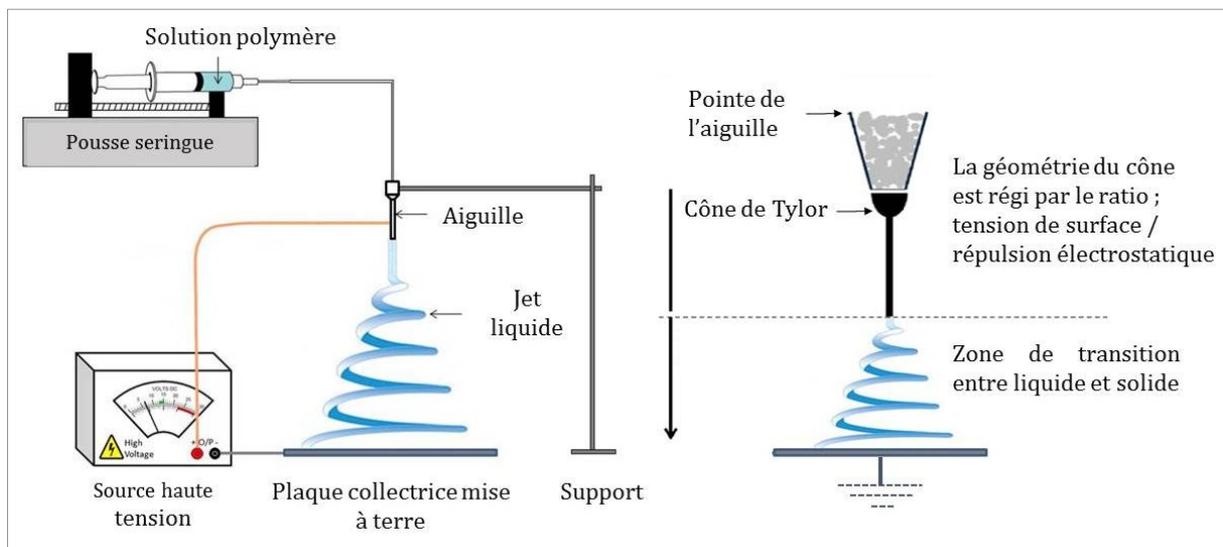


Figure 1 : Représentation schématique du montage vertical d'un appareil d'électrofilage et le phénomène d'électrofilage.

1.1.3 Polymères utilisés dans l'électrofilage :

Il existe une large gamme de polymères utilisés dans l'électrofilage qui sont capables de former des fibres fines dans la gamme nano ou micrométrique, et qui sont utilisées pour des applications variées. Il a été rapporté que les fibres électrofilées provenaient de divers polymères synthétiques, de polymères naturels ou d'un mélange des deux en comprenant des fois des protéines [16], des acides nucléiques [31] et même des polysaccharides [32]. Au fil des années, plus de 200 polymères ont été électrofilés avec succès à partir de plusieurs polymères naturels et caractérisés en fonction de leurs applications [33].

1.1.3.1 Polymères naturels et synthétiques :

De nos jours, une grande variété de polymères sont électrofilés et les fibres de ces solutions de polymères ont été utilisées dans diverses applications telles que les échafaudages d'ingénierie tissulaire, les membranes de filtration et dans diverses applications biomédicales. Les polymères d'origine naturelle présentent normalement une meilleure biocompatibilité et une faible immunogénicité, comparés aux polymères synthétiques, lorsqu'ils sont utilisés dans des applications biomédicales. L'une des principales raisons d'utiliser des polymères naturels pour l'électrofilage est leur capacité inhérente à se lier aux cellules puisqu'ils sont porteurs de séquences protéiques spécifiques, telles que les RGD (arginine/glycine/acide aspartique) [34]. Au cours des dernières décennies, l'électrofilage de protéines provenant principalement du collagène, de la gélatine, de l'élastine et de la fibroïne de soie a été rapporté [35-40]. Les polymères naturels typiques incluent le collagène (Col), le chitosan, la gélatine, la caséine, l'acétate de cellulose (AC), la protéine de soie, la chitine, le fibrinogène, etc. Les échafaudages fabriqués à partir de polymères naturels promettent une meilleure fonctionnalité et application clinique. Toutefois, ce qui est préoccupant, c'est qu'une dénaturation partielle des polymères naturels a été signalée ces dernières années. Zeugolis *et al.* [41] ont montré pour la première fois que les propriétés du collagène, un biomatériau naturel phare, sont perdues lorsqu'il est transformé par électrofilage en fibres à partir de fluoroalcools. Le collagène est un biopolymère majeur, et est largement utilisé en raison de ses excellentes propriétés biologiques et physico-chimiques pour des applications en ingénierie tissulaire. En 2008, Yang *et al.* [42] ont démontré que 45% du collagène est apparemment perdu pendant l'électrofilage.

Outre la dénaturation des polymères naturels, la fabrication de certains polymères naturels pose également d'autres problèmes. La laminine est un composant de la membrane basale supportant la fixation, la croissance et la différenciation cellulaire *in vitro*. Neal *et al.* [43] ont fabriqué des fibres de laminine I allant de 90 à 300 nm. Ils ont découvert que pour l'électrofilage de la laminine, il n'est pas nécessaire d'utiliser un agent de réticulation et que les caractéristiques structurelles sont conservées, contrairement au collagène.

Les polymères synthétiques offrent souvent de nombreux avantages par rapport aux polymères naturels, car ils peuvent être adaptés pour donner un plus large éventail de

propriétés telles que les propriétés mécaniques nécessaires (viscoélasticité et résistance) et le taux ou vitesse de dégradation souhaité [44]. Les polymères synthétiques typiques utilisés dans les applications biomédicales sont les polyesters biodégradables hydrophobes, tels que le PGA, le PLA et le PCL, qui ont tous été électrofilés en fibre.

Jusqu'à ce jour, l'électrofilage a été utilisé pour la fabrication d'échafaudages nanofibreux à partir de nombreux polymères biodégradables tels que le PCL, PLA, PGA, PU, Acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) et le copolymère poly(L-lactique-co- ϵ -caprolactone)[P (LLA-CL)] pour l'ingénierie tissulaire, les greffes cardiaques, les pansements et l'ingénierie des substituts de vaisseaux sanguins [45-46].

1.1.3.2 Copolymères :

L'électrofilage avec des copolymères permet une amélioration des propriétés des matériaux polymères, y compris l'adaptation de la stabilité thermique, de la résistance mécanique et des propriétés de barrière, et a donc souvent été recherché pour des applications structurales au travers de méthodes telles que la copolymérisation, le mélange à l'état fondu et l'incorporation de charges ou substances inorganiques [47].

L'utilisation de copolymères est une alternative sérieuse pour générer de nouveaux matériaux avec des propriétés souhaitées et, lorsqu'ils sont correctement mis en œuvre, les performances des échafaudages électrofilés à base de copolymères peuvent être considérablement améliorées par rapport aux homopolymères. Les polyesters hydrophobes biodégradables ont généralement de bonnes propriétés mécaniques mais manquent d'affinité cellulaire pour l'ingénierie tissulaire, mais avec l'incorporation d'un segment polymère hydrophile approprié, l'affinité cellulaire augmente. Outre l'affinité cellulaire, les propriétés mécaniques, la morphologie, la structure, la taille et la distribution des pores, la biodégradabilité et d'autres propriétés physiques peuvent également être adaptées par l'utilisation de copolymères en électrofilage.

Ainsi, l'électrofilage à base de copolymères apparaît comme une option intéressante pour améliorer les propriétés des polymères pour les applications d'ingénierie tissulaire.

1.2 Effets de divers paramètres sur le processus d'électrofilage

Le procédé d'électrofilage est régi par de nombreux paramètres, classés globalement en paramètres de la solution, paramètres du procédé et paramètres ambiants. Les paramètres de la solution comprennent la viscosité, la conductivité, le poids moléculaire et la tension superficielle, et les paramètres du procédé comprennent le champ électrique appliqué, la distance entre la pointe de l'aiguille et le collecteur et l'alimentation ou le débit de la solution. Chacun de ces paramètres affecte de manière significative la morphologie des fibres obtenue par électrofilage, et par une manipulation adéquate de ces paramètres, nous pouvons obtenir des fibres avec la morphologie et le diamètre désirés [13]. En plus de ces variables, les paramètres ambiants englobant l'humidité et la température de l'environnement, jouent un rôle important dans la détermination de la morphologie et du diamètre des fibres électrofilées.

Nous présentons les différents paramètres, ainsi que leurs effets sur la morphologie des fibres.

1.2.1 Paramètres de la solution :

1.2.1.1 Concentration :

Dans le processus d'électrofilage, pour qu'il y ait formation de fibres, une concentration minimale de solution est requise. Il a été constaté qu'à faible concentration, on obtient un mélange de perles et de fibres, et qu'à mesure que la concentration de la solution augmente, la forme des perles passe de sphérique à fusiforme et finalement des fibres uniformes de diamètre accru se forment en raison d'une plus grande résistance à la viscosité [48-50]. Il devrait y avoir une concentration optimale de la solution pour le procédé d'électrofilage, car à de faibles concentrations, des perles sont formées au lieu de fibres, et à de fortes concentrations, la formation de fibres continues est empêchée en raison de l'incapacité à maintenir le flux de la solution à l'extrémité de l'aiguille, ce qui entraîne la formation de fibres beaucoup plus grandes [51]. Les chercheurs ont essayé de trouver une relation entre la concentration de la solution et le diamètre des fibres, et ils ont trouvé une relation en loi de puissance, c'est-à-dire qu'en augmentant la concentration de la solution, on augmente le diamètre des fibres suite à l'électrofilage de gélatine [49].

La tension superficielle et la viscosité de la solution jouent également un rôle important dans la détermination de la plage de concentrations à partir de laquelle les fibres continues peuvent être obtenues en électrofilage [52].

1.2.1.2 Poids moléculaire :

Le poids moléculaire du polymère a un effet significatif sur les propriétés rhéologiques et électriques telles que la viscosité, la tension superficielle, la conductivité et la résistance ou rigidité diélectrique [50]. Le poids moléculaire est l'autre paramètre important de la solution qui affecte la morphologie de la fibre électrofilée, et généralement les solutions de polymères de poids moléculaire élevé ont été utilisées dans l'électrofilage car elles permettent d'avoir la viscosité désirée pour la génération de fibres. De plus, il a été observé qu'une solution de poids moléculaire trop faible tend à former des perles plutôt que des fibres, et qu'une solution de poids moléculaire élevé donne des fibres avec des diamètres moyens plus grands. Le poids moléculaire du polymère reflète le nombre d'enchevêtrements des chaînes polymères dans une solution, donc la viscosité de la solution. L'enchevêtrement des chaînes joue un rôle très important dans le processus d'électrofilage. Ainsi, même lorsque la concentration du polymère est faible, HM-PLLA (acide poly-L-lactique de poids moléculaire élevé) peut maintenir un nombre suffisant d'enchevêtrements des chaînes polymères, assurant ainsi un niveau suffisant de viscosité de la solution pour produire un jet uniforme pendant le processus d'électrofilage, et limiter les effets de la tension superficielle, qui joue un rôle important dans la formation de perles sur les fibres électrofilées [53].

De plus, il a été observé que des poids moléculaires élevés ne sont pas toujours essentiels pour le processus d'électrofilage si des interactions intermoléculaires suffisantes pouvaient fournir un substitut à la connectivité interchaîne obtenue par l'enchevêtrement des chaînes, et en utilisant ce principe, les chercheurs ont préparé des membranes non-tissées par électrofilage de phospholipides de taille oligomère à partir de solutions de lécithine [54-55].

1.2.1.3 Viscosité :

La viscosité de la solution joue un rôle important dans la détermination de la taille et de la morphologie des fibres lors de l'électrofilage des fibres polymères. Il a été constaté qu'avec

une très faible viscosité, il n'y a pas de formation continue de fibres et qu'avec une viscosité très élevée, il est difficile d'éjecter les jets de la solution polymère, d'où l'exigence d'une viscosité optimale pour l'électrofilage.

Fong *et al.* (1999) [56] ont étudié la formation de fibres d'oxyde de polyéthylène (PEO) avec différentes viscosités et ont découvert qu'une plage de viscosité comprise entre 1 et 20 poises, convient à la production de fibres uniformes par électrofilage (Fig. 2) [103].

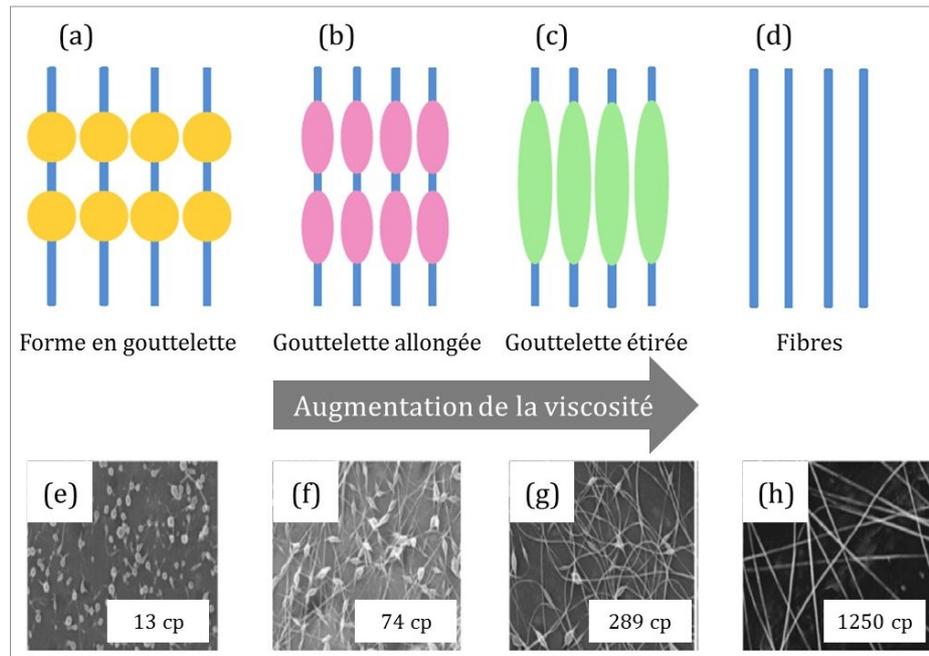


Figure 2 : Variation de la morphologie des fibres de PEO électrofilées avec la viscosité: (a – d) représentations schématiques et (e – h) micrographies au microscope électronique à balayage.

La viscosité, la concentration du polymère et le poids moléculaire du polymère sont corrélés entre eux. La viscosité de la solution a été fortement liée à la concentration de la solution et la relation entre la viscosité et/ou la concentration du polymère, et les fibres obtenues par électrofilage a été étudiée dans un certain nombre de systèmes, dont le PLGA [57], PEO [58], alcool poly vinylique (PVA) [24], poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) [59], le polystyrène (PS) [60], la gélatine [49] et le dextran [33]. Les solutions de polymères à très haute viscosité présentent généralement des temps de relaxation des contraintes plus longs, ce qui pourrait empêcher la discontinuité des jets éjectés pendant l'électrofilage. Pour les solutions de faible viscosité, la tension superficielle est le facteur dominant et seules des perles ou des fibres perlées sont formées alors qu'au-dessus d'une concentration critique,

une structure fibreuse continue est obtenue et sa morphologie est affectée par la concentration de la solution.

L'ensemble de ces études indique qu'il existe des valeurs de viscosité optimales spécifiques aux polymères pour l'électrofilage, et que cette propriété a une influence remarquable sur la morphologie des fibres.

1.2.1.4 Tension superficielle :

La tension superficielle, plus susceptible d'être fonction de la composition des solvants de la solution, joue un rôle critique dans le processus d'électrofilage. En réduisant la tension superficielle d'une solution ; les fibres peuvent être obtenues sans perles. Différents solvants peuvent contribuer à différentes tensions superficielles. Généralement, la tension superficielle élevée d'une solution inhibe le processus d'électrofilage en raison de l'instabilité des jets et de la formation de gouttelettes pulvérisées [61]. La formation de gouttelettes, de perles et de fibres dépend de la tension superficielle de la solution et une tension superficielle plus faible de la solution à électrofiler aide l'électrofilage à se produire à un champ électrique plus bas [50]. Cependant, une tension superficielle plus faible d'un solvant n'est pas nécessairement plus appropriée pour l'électrofilage. Fondamentalement, la tension superficielle détermine les limites supérieure et inférieure de la fenêtre d'électrofilage si toutes les autres variables sont maintenues constantes [24,27,56].

1.2.1.5 Conductivité / densité de charge de surface :

Les polymères sont principalement conducteurs, à quelques exceptions près des matériaux diélectriques, et les ions chargés dans la solution de polymère ont une grande influence sur la formation des jets. La conductivité de la solution est principalement déterminée par le type de polymère, le solvant utilisé et la disponibilité des sels ionisables. Il a été constaté qu'avec l'augmentation de la conductivité électrique de la solution, il y a une diminution significative du diamètre des fibres électrofilées, alors qu'avec une faible conductivité de la solution, il en résulte un allongement insuffisant du jet par la force électrique pour produire une fibre uniforme, et des perles peuvent également être observées.

Généralement, les fibres électrofilées présentant le plus petit diamètre peuvent être obtenues avec la conductivité électrique la plus élevée, et il a été constaté que la diminution

de la taille des fibres est due à la conductivité électrique accrue. Il a aussi été observé que le rayon du jet variait inversement avec la racine cubique de la conductivité électrique de la solution [33,50,56]. Les polymères naturels, par exemple la gélatine, sont généralement de nature poly-électrolytique. Les ions augmentent la capacité de charge du jet, le soumettant ainsi à une tension plus élevée avec le champ électrique appliqué. Ainsi, la capacité de formation des fibres de gélatine est inférieure à celle de la gélatine synthétique [62]. Avec l'utilisation de sels, l'uniformité des fibres augmente et il y a une diminution de la génération de perles.

1.2.2 Paramètres du processus d'électrofilage :

1.2.2.1 Tension (ou voltage) appliquée :

Dans le processus d'électrofilage, la tension appliquée à la solution est un élément crucial. Ce n'est qu'après avoir atteint une valeur de tension seuil que la formation de fibres peut se produire, ce qui induit les charges nécessaires entre la solution et le champ électrique, et déclenche le processus d'électrofilage. Il a déjà été prouvé expérimentalement que la forme de la goutte initiatrice change avec les conditions d'électrofilage (tension, viscosité et débit de la solution) [63]. Il existe un petit différend au sujet du comportement de la tension appliquée dans le processus d'électrofilage. Reneker et Chun (1996) [64] ont montré qu'il n'y a pas beaucoup d'effet du champ électrique sur le diamètre des fibres pour l'électrofilage de PEO. D'autres chercheurs ont suggéré que lorsque des tensions plus élevées sont appliquées, il y a plus d'éjection de polymère, ce qui facilite la formation d'une fibre de plus grand diamètre [24]. D'autres auteurs ont, quant à eux, rapporté qu'une augmentation de la tension appliquée (c.-à-d., en augmentant l'intensité du champ électrique), augmente la force répulsive électrostatique sur le jet du fluide, ce qui favorise finalement le rétrécissement du diamètre des fibres.

Dans la plupart des cas, une tension plus élevée provoque un plus grand étirement de la solution, en raison des forces coulombiques plus importantes dans le jet, et un champ électrique plus fort. Ces effets entraînent une réduction du diamètre des fibres ainsi qu'une évaporation rapide du solvant. Ainsi, la tension influence le diamètre des fibres, mais le niveau de signification varie en fonction de la concentration de la solution polymère et de la distance entre la pointe de l'aiguille et le collecteur (Fig. 3) [65,66].

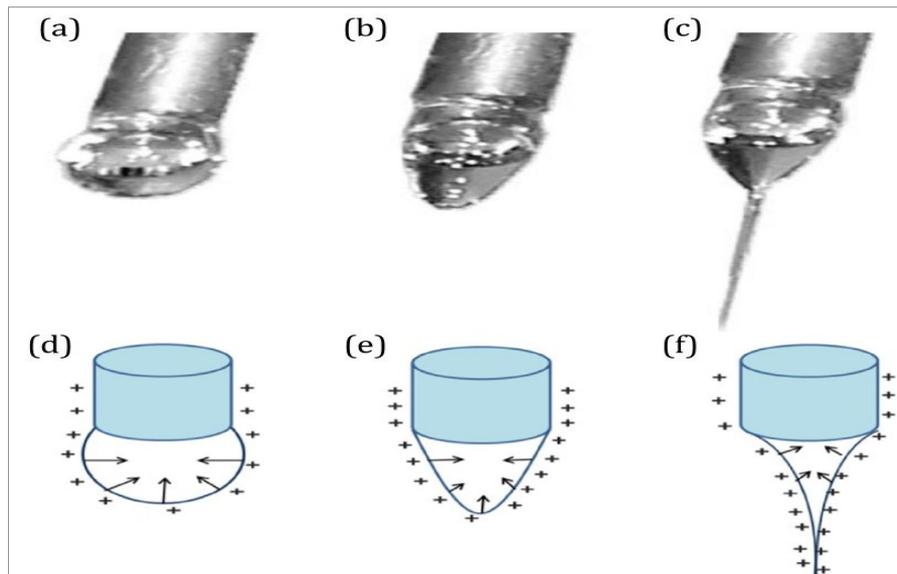


Figure 3 : (a – c) Images numériques montrant la déformation en trois étapes de la gouttelette de polyvinylpyrrolidone sous l'effet du champ électrique. Les dessins (d – f) montrent le mécanisme de l'effet de charges sur les gouttelettes polymères.

1.2.2.2 Débit de la solution / vitesse d'alimentation :

Le débit de la solution polymère à partir de la seringue est un paramètre de procédé important, car il influence la vitesse du jet et le taux (ou débit) de transfert du matériau. Une faible vitesse d'alimentation est plus souhaitable, car le solvant aura suffisamment de temps pour s'évaporer [67]. Il doit toujours y avoir un débit minimum de la solution. Il a été observé que le diamètre des fibres et le diamètre des pores augmentent avec l'augmentation du débit de la solution polymère dans le cas des fibres de PS et qu'en modifiant le débit, la morphologie de structure peut être légèrement modifiée.

Peu de travaux ont exploré de façon approfondie la relation entre le débit de la solution, la morphologie et la taille des fibres [62]. Des débits élevés entraînent la formation de fibres perlées, en raison de l'indisponibilité d'un temps de séchage (ou temps d'évaporation du solvant) suffisant avant que les fibres n'atteignent le collecteur [57,67].

1.2.2.3 Types de collecteur :

Le type de collecteur utilisé revêt un aspect important du processus d'électrofilage. Dans ce processus, un collecteur sert de substrat conducteur où les fibres sont collectées. Généralement, une feuille d'aluminium est utilisée comme collecteur, mais en raison de la difficulté, parfois, à transférer les fibres collectées et du besoin d'obtenir des fibres

alignées pour diverses applications, d'autres collecteurs tels que du papier conducteur, tissu conducteur, treillis métallique [68], broches [69], des barre parallèles [70], une tige rotative, une roue tournante [46], les liquides non solvants tels que le bain de coagulation méthanol [71] et autres, sont aussi des collecteurs courants de nos jours.

L'alignement des fibres est déterminé par le type de collecteur et sa vitesse de rotation [72]. Les fibres générées sont déposées sur le collecteur sous forme de masse aléatoire en raison de l'instabilité en flexion du jet fortement chargé [5]. Plusieurs groupes de recherche ont démontré l'obtention de fibres électrofilées alignées plus ou moins parallèles entre elles, en utilisant un tambour rotatif, ou une bobine en forme de roue tournante, ou un cadre métallique comme collecteurs [52,73].

1.2.2.4 Distance entre la pointe de l'aiguille et le collecteur :

La distance entre la pointe de l'aiguille et le collecteur a été étudiée comme une autre approche pour contrôler le diamètre et la morphologie des fibres. Il a été constaté qu'une distance minimale était nécessaire pour que les fibres aient le temps de sécher avant d'atteindre le collecteur, sinon avec des distances trop proches ou trop éloignées, des perles sont formées [74].

L'effet de la distance entre la pointe et le collecteur sur la morphologie des fibres n'est pas aussi significatif que d'autres paramètres, et cela a été observé avec l'électrofilage du PVA [24], de la gélatine [49] et du chitosan [75]. De plus, des fibres plus plates peuvent être produites à des distances plus proches, mais avec l'augmentation de la distance, des fibres plus rondes sont observées avec l'électrofilage d'un polymère semblable à de la soie avec une fonctionnalité fibronectine [76].

Dans le cas du PCL, des distances plus étroites entre la pointe et le collecteur ont donné des fibres plus petites [27]. Un des aspects physiques importants des fibres électrofilées est le fait qu'elles ne contiennent pas de solvant (sécheresse en solvant) utilisé pour dissoudre le polymère [77]. Ainsi, il doit y avoir une distance optimale entre la pointe et le collecteur, de façon à ce que l'évaporation du solvant des fibres soit favorisée.

1.2.2.5 Diamètre d'aiguille :

Le diamètre de l'aiguille, utilisée pour l'électrofilage, a également une influence sur le diamètre des fibres. Tong et Wang (2011) [78] ont étudié l'influence du diamètre de l'aiguille sur des fibres de poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalérate) (PHBV) électrofilées. Cette étude a montré que les fibres ultrafines ne pouvaient être électrofilées avec succès qu'à partir d'une aiguille d'un diamètre inférieur ou égal à 0,7 mm (21 G).

Les polymères présentent généralement des viscosités différentes, bien qu'ils aient la même concentration, il est donc nécessaire de redéfinir le diamètre approprié de l'aiguille lors de la fabrication de fibres à partir d'une autre solution de polymère quand on utilise la même configuration.

1.2.3 Paramètres ambiants :

Outre les paramètres de la solution et du processus, il existe également des paramètres ambiants tels que l'humidité et la température, qui affectent également le diamètre et la morphologie des fibres [79-80].

Des études ont été menées pour examiner les effets des paramètres ambiants (c.-à-d. la température et l'humidité) sur le procédé d'électrofilage. La température provoque deux effets opposés, qui modifient le diamètre moyen des fibres : (i) elle augmente le taux d'évaporation du solvant et (ii) diminue la viscosité de la solution (relation inverse entre température et viscosité). L'augmentation de l'évaporation du solvant et la diminution de la viscosité agissent par deux mécanismes opposés, cependant, les deux conduisent à une diminution de la moyenne du diamètre des fibres. De Vrieze *et al.* (2009) [81] ont signalé une observation similaire avec du CA et du poly(vinylpyrrolidone) (PVP).

La variation de l'humidité pendant l'électrofilage de solutions de PS a été étudiée et montre qu'en augmentant l'humidité, de petits pores circulaires apparaissent à la surface des fibres; en augmentant davantage l'humidité, les pores confluent et finissent par fusionner [82]. Il a été constaté qu'à un très faible taux d'humidité, un solvant volatil peut sécher rapidement car l'évaporation du solvant est plus rapide. Il a également été suggéré qu'un taux d'humidité élevé peut aider à la production des fibres électrofilées [35].

L'humidité provoque des changements dans le diamètre des fibres en contrôlant le processus de solidification du jet chargé. Ce phénomène dépend toutefois de la nature chimique du polymère.

Bae et coll. [83] ont utilisé du PMMA et un système de solvant binaire dichlorométhane (DCM) : diméthylformamide (DMF) avec un rapport de 8:2 pour produire des fibres hautement poreuses. La création des pores a été attribuée aux différents taux d'évaporation des deux solvants. Le solvant le plus volatil (DCM) commence à s'évaporer plus rapidement que le solvant le moins volatil (DMF) (alors que les fibres sont encore en vol vers le collecteur ; Fig. 4). Cette différence de taux de d'évaporation des deux solvants provoque un effet de refroidissement.

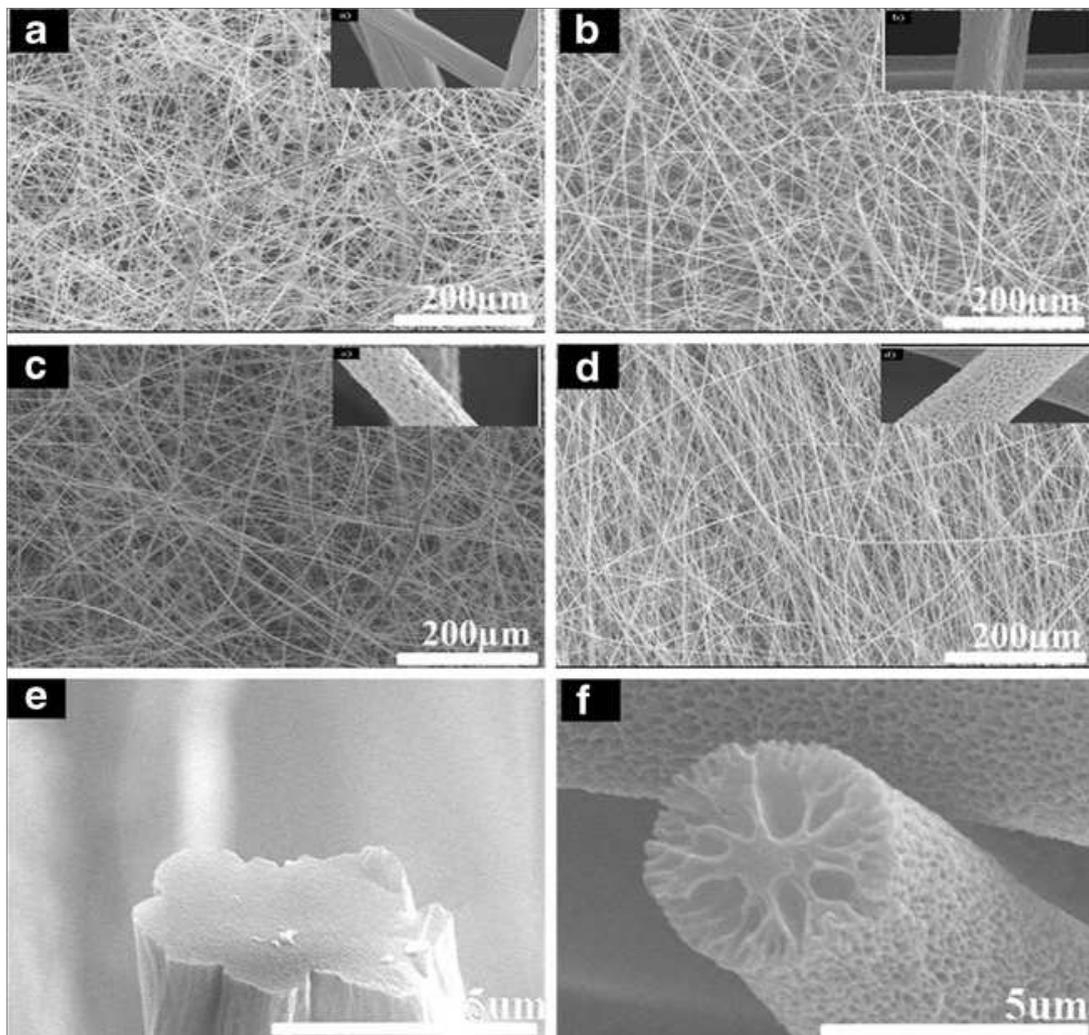


Figure 4 : Images FE-SEM (Microscopie électronique à balayage à émission de champ) de fibres de polyméthacrylate de méthyle (PMMA) électrofilées avec des taux d'humidité différents: a) 15-25%, b) 26-40%, c) 41-55%, d) 56-70%, e) section transversale d'une fibre non poreuse, et (f) section transversale d'une fibre poreuse.

Cet effet de refroidissement se traduit par la condensation de la vapeur d'eau en gouttelettes d'eau. Par la suite, ces gouttelettes d'eau se déposent sur les fibres. Comme l'eau est miscible avec le DMF, les deux se mélangent bien l'un à l'autre sur les surfaces intérieure et extérieure des fibres. L'évaporation complète des solvants et des gouttelettes d'eau provenant des fibres, entraîne la formation de fibres de PMMA poreuses (Fig. 4) [83].

1.3 Solvants utilisés pour l'électrofilage :

Le solvant utilisé dans la préparation d'une solution polymère a une influence significative sur la capacité à pouvoir électrofiler ce polymère, puisque la première étape du processus d'électrofilage est la dissolution du polymère dans un solvant approprié.

Les solvants doivent avoir certaines propriétés telles qu'une bonne volatilité, la pression de vapeur, le point d'ébullition et doivent maintenir l'intégrité de la solution polymère. De ce fait, le choix du solvant, ou du mélange de solvants, approprié est donc indispensable pour bien réussir l'électrofilage. L'interaction intermoléculaire dans un système solvant-polymère (système binaire) est soit attractive, soit répulsive et dépend uniquement du type de solvant [84].

Dans l'électrofilage, l'évaporation rapide du solvant et la séparation des phases sont dues à l'amincissement du jet, et la pression de vapeur du solvant joue un rôle critique dans la détermination du taux d'évaporation et du temps de séchage. La volatilité des solvants joue également un rôle important dans la formation des fibres car elle influence le processus de séparation des phases. Divers groupes de recherche ont étudié l'effet des solvants, notamment le chloroforme (CF), l'éthanol (EtOH), le diméthylformamide (DMF), le mélange acide trifluoroacétique et DCM et d'eau pour l'électrofilage du PEO, du PS et du poly(éthylène téréphtalate) et ont montré l'effet des propriétés des solvants et la concentration des polymères sur la morphologie, la structure, les propriétés mécaniques et thermiques pendant l'électrofilage [60,85].

Différents solvants peuvent contribuer à différentes tensions superficielles. La viscosité de la solution est déterminée par la concentration du polymère, mais la valeur de la tension superficielle dépend du polymère et du solvant [64].

Une faible tension superficielle du solvant ne convient pas toujours nécessairement à l'électrofilage [5,56]. Les propriétés des solvants ont un effet considérable sur le diamètre des fibres. Le Tableau 1, nous montre différentes propriétés des solvants, qui doivent être prises en compte lors de la sélection du solvant pour le procédé d'électrofilage.

Tableau 1 : Propriétés des différents solvants utilisés dans le procédé d'électrofilage

Solvants	Tension de surface (mN/m)	Constante diélectrique	Point d'ébullition (°C)	Densité (g/ml)
Chloroforme	26,5	4,8	61,6	1,498
Diméthyleformamide	37,1	38,3	153	0,994
Hexafluoroisopropanol	16,1	16,7	58,2	1,596
Tétrahydrofurane	26,4	7,5	66	0,886
Trifluoro Ethanol	21,1	27	78	1,393
Acétone	25,2	21	56,1	0,786
Eau	72,8	80	100	1
Méthanol	22,3	33	64,5	0,791
Acide acétique	26,9	6,2	118,1	1,049
Acide formique	37	58	100	1,21
Dichlorométhane	27,2	9,1	40	1,326
Ethanol	21,9	24	78,3	0,789

Fondamentalement, un solvant joue deux rôles cruciaux dans l'électrofilage : premièrement, dissoudre les molécules de polymère pour former le jet électrisé et deuxièmement, transporter les molécules de polymère dissoutes vers le collecteur [86].

Les solvants utilisés dans l'électrofilage des polymères peuvent fournir des informations très utiles pour comprendre l'effet des propriétés des solutions telles que la conductivité. Le DMF, solvant aprotique dipolaire à haute constante diélectrique et moment dipolaire, a été utilisé avec succès comme solvant pour l'électrofilage du poly(acrylonitrile) et du copolymère polyuréthane urée et du copolymère biodégradable poly(p-dioxanone-co-L-lactique)-bloc-poly(éthylène glycol). Son addition améliore la conductivité en solution, préalable à la formation des fibres uniformes sans perles [76,87].

Dans le processus d'électrofilage, comme il est expliqué plus haut, le filage et la morphologie des fibres sont fortement dépendants des caractéristiques de la solution, telles que la viscosité, la conductivité, etc. Par conséquent, le choix du solvant est principalement dicté par la solubilité du polymère, le point d'ébullition, et la constante diélectrique du solvant, ainsi que par son caractère volatil. Pendant le procédé d'électrofilage, le solvant s'évapore tandis que le jet de fluide s'accélère vers le collecteur.

Pendant ce parcours, si la plus grande partie du solvant s'évapore, des fibres individuelles se forment. Si ce n'est pas le cas, soit, les fibres peuvent ne pas se former du tout, soit un film fin de solution polymère est déposé sur le collecteur.

La plupart des polymères utilisés dans l'électrofilage sont non soluble en milieu aqueux. Par conséquent, l'utilisation de solvants organiques présentant une toxicité élevée est inévitable. En effet, des produits chimiques dangereux, tels que le DMF, DCM, tétrahydrofurane (THF), hexafluoroisopropanol (HFIP), CF, acide acrylique, et ainsi de suite, sont les solvants les plus couramment utilisés pour la production de fibres électrofilées. Ces solvants ont généralement de bas points d'ébullition, et une capacité à dissoudre la plupart des polymères synthétiques et naturels.

Une fraction du solvant utilisé pour l'électrofilage peut être retenue dans les fibres résultantes et pourrait influencer l'activité ou la fonction biologique d'un échafaudage, de manière positive ou négative [88].

Le solvant résiduel dans les fibres électrofilées, et sa lixiviation ultérieure au cours d'une application *in vitro* ou *in vivo* a fait l'objet de plusieurs études. Par exemple, Canbolat *et al.* (2011) [89] ont montré qu'en stratification cellulaire, le choix du solvant est crucial, puisque le solvant résiduel dans les fibres électrofilées pourrait être déterminant pour les cellules.

Dans une autre étude, Nam *et al.* (2008) [90] ont observé que la composition du polymère a une forte influence sur la quantité de solvant résiduel dans les fibres électrofilées. Par exemple, contrairement à la gélatine, qui a une grande affinité pour le HFIP, le PCL n'a presque pas d'affinité pour l'acétone et le HFIP. Il est intéressant de noter que les chercheurs ont montré qu'en appliquant un simple traitement sous vide et thermique, la quantité de solvant résiduel peut être réduite à n'ayant pas d'effets démonstratifs sur les cellules des mammifères. Weldon *et al.* (2012) [91] ont également montré que, malgré le fait que des résidus de HFIP aient été présents dans les fibres électrofilées de PLGA, et aient influencé la dégradation et le comportement mécanique, la quantité de HFIP présente était tellement faible qu'elle ne pouvait induire aucune toxicité, qu'elle soit *in vitro* ou *in vivo*.

La présence possible de solvant dans les fibres électrofilées ne peut être exclue [92-93]. Cependant, il est important de noter que le choix des matériaux a une forte influence sur la quantité du solvant résiduel.

Certains polymères possèdent une grande affinité pour certains solvants, et montrent donc une forte probabilité de contenir du solvant résiduel après l'électrofilage. Toutefois, si les échantillons électrofilés subissent un traitement post-fabrication approprié, pour éliminer le solvant que ce soit sous vide ou par un traitement thermique, la toxicité du solvant n'est pas préoccupante, car la quantité est beaucoup trop faible pour induire une toxicité. Néanmoins, la préférence demeure la production de fibres plus biocompatibles et avec des solvants bénins (moins toxique) ou simplement sans solvant.

1.4 Applications biomédicales des fibres électrofilées :

Différents polymères ont été transformés en fibres électrofilées, pour être utilisés dans de nombreuses applications biomédicales. Dans la partie suivante, les récentes applications biomédicales des fibres ou membranes électrofilées sont examinées.

1.4.1 Administration ou délivrance de médicaments :

Différents systèmes d'administration de médicaments par fibres électrofilées ont été mis au point pour l'administration locale d'agents thérapeutiques, en raison de la grande flexibilité dans le choix des matériaux, la facilité d'encapsulation des médicaments et le haut niveau de polyvalence des formulations de médicaments. La microstructure d'une seule fibre et la macrostructure intégrale des échafaudages en fibres électrofilées permettent d'obtenir un très bon contrôle des profils de libération des médicaments. Comme le montre la figure 5. A [94], des profils de libération très différents ont été obtenus pour de nombreuses applications, notamment la libération biphasique, la libération en ordre zéro, la libération déclenchée par stimulus, la libération séquentielle et la libération spatiotemporelle.

Les systèmes d'administration, à base de fibres sensibles aux stimuli, déclenchés par stimuli permettent d'ajuster la libération du médicament au bon endroit et au bon moment, ce qui permet d'augmenter l'efficacité thérapeutique et de minimiser les effets secondaires.

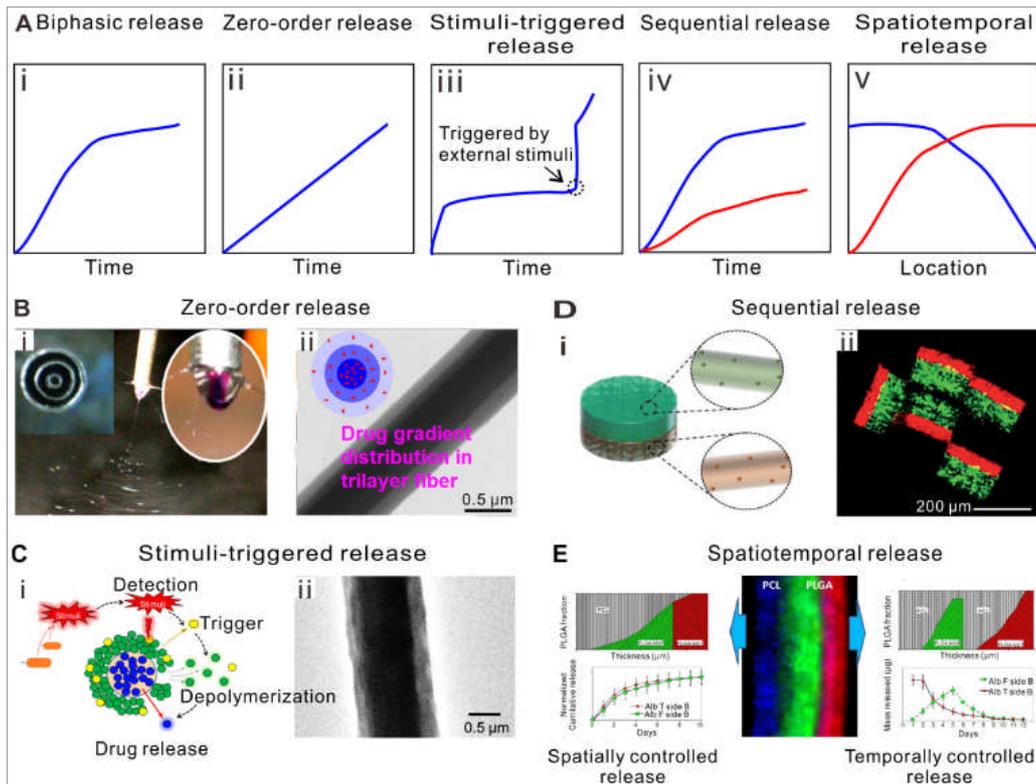


Figure 5 : Fibres électrofilées pour une libération contrôlée de médicaments.¹

Malgré des démonstrations de faisabilité *in vitro* réussies, seules quelques études *in vivo* ont été rapportées. La complexité de l'administration, la faible sensibilité dans les environnements physiologiques *in vivo* et la nécessité de matériaux non dégradables peuvent limiter leurs applications. Toutes ces questions doivent être abordées dans des études futures.

La régénération tissulaire est un processus physiologique coordonné impliquant l'assemblage opportun et spatial de biomolécules, de protéines et de facteurs de croissance multiples. Il est de plus en plus nécessaire d'administrer avec précision de multiples biomolécules dans un temps et un espace spécifiques [99].

À l'avenir, les fibres électrofilées peuvent être conçues pour la programmation de la libération spatio-temporelle de médicaments. Les modèles conçus, composés de fibres de

¹ (A) Courbes de libération représentatives, y compris (i) la libération biphasique, (ii) la libération en ordre zéro, (iii) la libération déclenchée par stimulus, (iv) la libération séquentielle et (v) la libération spatiotemporelle. (B) Libération d'ordre zéro à partir de fibres à trois couches fabriquées par électrofilage triaxial [95]. (C) Libération déclenchée par stimulation à partir de fibres fabriquées par électrofilage coaxial de polymères sensibles à la stimulation [96]. (D) Libération séquentielle de microparticules d'hydrogel fabriquées par la combinaison d'électrofilage séquentiel et de photopatterning (photomodélisation) [97]. (E) Libération spatio-temporelle à partir de fibres fabriquées par programmation du dépôt de fibres hétérogènes [98].

PCL et de PLGA chargées de différents médicaments sur des côtés opposés, ont entraîné une libération contrôlée dans l'espace (Fig. 5. E) [98].

Le développement de systèmes spatio-temporels d'administration de médicaments apporte des bénéfices sans précédent en médecine régénérative. Les systèmes de délivrance spatiale pourraient faciliter la régénération des interfaces tissulaires telles que les sites d'insertion tendon/ligament-à-os.

À l'avenir, la combinaison de différentes plates-formes d'administration de médicaments telles que les nanoparticules, les liposomes et les hydrogels offrira une très grande polyvalence dans l'administration spatiotemporelle de médicaments.

1.4.2 Contrôle du comportement cellulaire :

Le microenvironnement cellulaire est crucial pour la régulation du comportement cellulaire et de la fonction des tissus. Les signaux distincts du microenvironnement, y compris les facteurs chimiques, biologiques, mécaniques et électriques, influent collectivement sur le comportement cellulaire dont, l'adhésion, la prolifération, la différenciation et la migration des cellules. Les fibres électrofilées qui fournissent une imitation proche de la matrice extra cellulaire (MEC) offrent un environnement plus propice au contrôle du comportement cellulaire.

1.4.2.1 Adhésion cellulaire :

Il existe de nombreuses preuves que la composition des fibres joue un rôle important dans l'adhésion et la prolifération cellulaire [100]. Contrairement aux polymères synthétiques tels que PCL, PLA et PLGA, les polymères naturels tels que le collagène, la gélatine, la fibronectine, l'AH et le chitosan offrent des sites d'interaction spécifiques avec les cellules via des récepteurs d'adhésion à la surface cellulaire appelés intégrines, et soutiennent l'adhésion et la prolifération cellulaire.

Le revêtement de surface de polymères naturels, des peptides, des facteurs de croissance et du plasma riche en plaquettes peuvent améliorer davantage l'adhésion cellulaire en utilisant l'électrofilage coaxial ou une modification de la surface [101]. Par exemple, l'acide arginine-glycine-aspartique (RGD), un peptide dérivé de la séquence d'adhésion cellulaire de la fibronectine, a été largement utilisé pour ajuster l'adhésion

cellulaire [102]. Cependant, ce peptide conduit à une adhésion de tous les types de cellules, sans spécificité.

À cette fin, une plus grande attention a été accordée à la fonctionnalisation des fibres électrofilées avec des peptides d'affinité spécifique. Des chercheurs ont rapporté, la préparation en une étape de fibres PLGA/PEO en étoiles (20:1) [103]. L'immobilisation subséquente de peptides GRGDS a spécifiquement activé l'adhésion cellulaire par l'identification sélective des motifs de liaison immobilisés.

1.4.2.2 Prolifération/expansion cellulaire :

La difficulté de l'expansion des cellules ex vivo en nombres cliniquement pertinents représente le principal obstacle à la thérapie cellulaire. Il a été supposé, que les fibres électrofilées avec fonctionnalisation de surface simulant le maillage ou réseau 3D complexe de la MEC pourraient servir de niche pour réguler la prolifération cellulaire. La prolifération des cellules corrigées avec des gènes modifiés est entravée par la réduction du phénotype de prolifération (RPP). Des chercheurs ont démontré que certaines cellules HCT116-19 avec un gène de protéine fluorescente verte (eGFP) intégré, mutée et améliorée, sur des échafaudages en fibre PCL recouverts de polylysine ou fibronectine [104]. Les échafaudages en fibres électrofilées semblaient restaurer l'activité de la fourche de réplication, améliorer l'inversion du RPP et augmenter le potentiel de l'édition de gènes pour des applications thérapeutiques.

Dans une autre étude, des mailles de fibres aminées présentaient l'efficacité d'expansion la plus élevée pour des cellules souches/progénitrices hématopoïétiques (CD34⁺CD45⁺) comparativement aux fibres et films de poly(éthersulfone) (PES) non modifiés, hydroxylés et carboxylés [105]. Cependant, les mécanismes précis de promotion de la prolifération cellulaire restent à élucider.

Après l'expansion, la façon de recueillir les cellules pour la thérapie n'a pas encore été entièrement étudiée. Les fibres de poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) avec des modifications de surface pourraient servir de meilleure plateforme pour l'expansion de ces cellules car elles peuvent être facilement collectées par simple changement de la température après culture.

1.4.2.3 Différenciation cellulaire :

La thérapie par cellules souches offre des perspectives intéressantes pour améliorer l'efficacité du traitement de nombreuses maladies. Cependant, quel que soit le type de cellules souches, le pauvre contrôle de la différenciation cellulaire demeure un problème majeur. Pour résoudre ce problème, il est nécessaire de disposer de supports optimaux capables d'orienter la différenciation des cellules souches en lignées spécifiques pour la régénération tissulaire. La taille des fibres est un facteur qui influence la différenciation cellulaire [106]. L'alignement des fibres est un autre facteur qui fournit des repères topographiques pour diriger la différenciation cellulaire [107]. Les échafaudages constitués de fibres alignées ont induit une différenciation *in vitro* des CSMs en ténocytes, et la formation de tissus tendineux après l'implantation *in vivo*. D'autre part, les échafaudages en fibres aléatoires ont favorisé l'ostéogenèse des CSMs *in vitro*, ainsi que l'ossification des tissus et la formation osseuse au site de la lésion [108].

Les propriétés mécaniques des fibres électrofilées est un autre facteur important qui peut réguler la différenciation des cellules souches. Par exemple, les fibres électrofilées souples soutenaient la chondrogénèse des cellules progénitrices mésenchymateuses embryonnaires, et les fibres rigides offraient un microenvironnement plus approprié pour la différenciation ostéogénique [109]. De plus, il a été démontré que la stimulation mécanique en conjugaison avec l'alignement des fibres électrofilées était suffisante pour entraîner la différenciation des CSMs [110].

Il est particulièrement intéressant de noter que le signal électrique peut réguler l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules [111] et faciliter la régénération des tissus nerveux, cardiaques et des muscles squelettiques [112-113].

Plus important encore, les échafaudages en fibres fonctionnalisés, dotés d'une livraison soutenue de signaux biologiques appropriés [114-115], peuvent améliorer considérablement la différenciation des cellules souches sur une longue période d'exposition.

Afin d'obtenir un contrôle précis de la différenciation des cellules souches, d'autres études pourraient envisager l'administration séquentielle de biomolécules multiples à partir d'échafaudages de fibres. Une autre orientation future pourrait envisager la fonctionnalisation spatiale de facteurs de croissance spécifiques afin de compartimenter

la différenciation des cellules souches pour la régénération des interfaces, comme le site d'insertion tendon/cartilage-à-os.

1.4.2.4 Migration cellulaire :

La migration cellulaire joue un rôle majeur dans le développement embryonnaire, la réponse immunitaire, la cicatrisation des plaies, la progression de cancer et la régénération des tissus [116]. L'orientation topographique est essentielle pour la migration cellulaire. Les fibres électrofilées alignées ont amélioré la migration cellulaire le long de la direction de l'alignement des fibres par rapport aux fibres aléatoires [117-118]. Des transplantations ultérieures d'échafaudages de fibres alignées dans le site de la lésion ont permis une validation *in vivo*. Par exemple, un hydrogel en fibrine alignée a induit une migration rapide des cellules neurales endogènes pendant une réparation des lésions de la moelle épinière [119] et favorisé une migration rapide des cellules de Schwann pendant une réparation du nerf périphérique [120].

Un échafaudage innovant composé de fibres alignées radialement a été développé par Xie et al 2010 [121] (Fig. 6. Aii). Des fibroblastes cultivés à la périphérie de fibres radialement alignées ont été allongés et leur migration le long des fibres alignées vers le centre de l'échafaudage a été fortement accélérée (Fig. 6. Aiii-vi). De plus, un arrangement élevé de collagène de type I a été observé, ce qui confirme une application potentielle des échafaudages de fibres alignés radialement pour la réparation durale et la cicatrisation des plaies. Pour comprendre le mécanisme, la migration des cellules en réponse à différentes géométries de fibres a été expliquée par une simple lecture mécanique de la géométrie [122].

Outre la topographie, les propriétés mécaniques affectent également la migration cellulaire. Dans le cadre d'une étude portant sur la migration des tumeurs cérébrales malignes, des fibres électrofilées en système noyau-gaine à alignement uni-axial comme modèles *in vitro*, imitant les voies topographiques de la substance blanche, ont été développées [123]. Les fibres de PCL et des fibres préparées en système noyau-gaine ; gélatine-PCL, PES-PCL et Polydiméthylsiloxane (PDMS)-PCL, ont donné des modules mécaniques très différents de 7.9 MPa, 2.4 MPa, 28.6 MPa et 33.3 MPa, respectivement. Les cellules de glioblastomes GBM (OSU-2) provenant de patients ont montré la vitesse de migration la plus rapide sur les fibres à module intermédiaire (fibres PCL), et une

vitesse de migration plus lente sur les fibres à module inférieur (fibres gélatine-PCL) et à module supérieur (fibres PES-PCL et PDMS-PCL), indiquant que le glioblastome multiforme est sensible aux propriétés mécaniques des fibres.

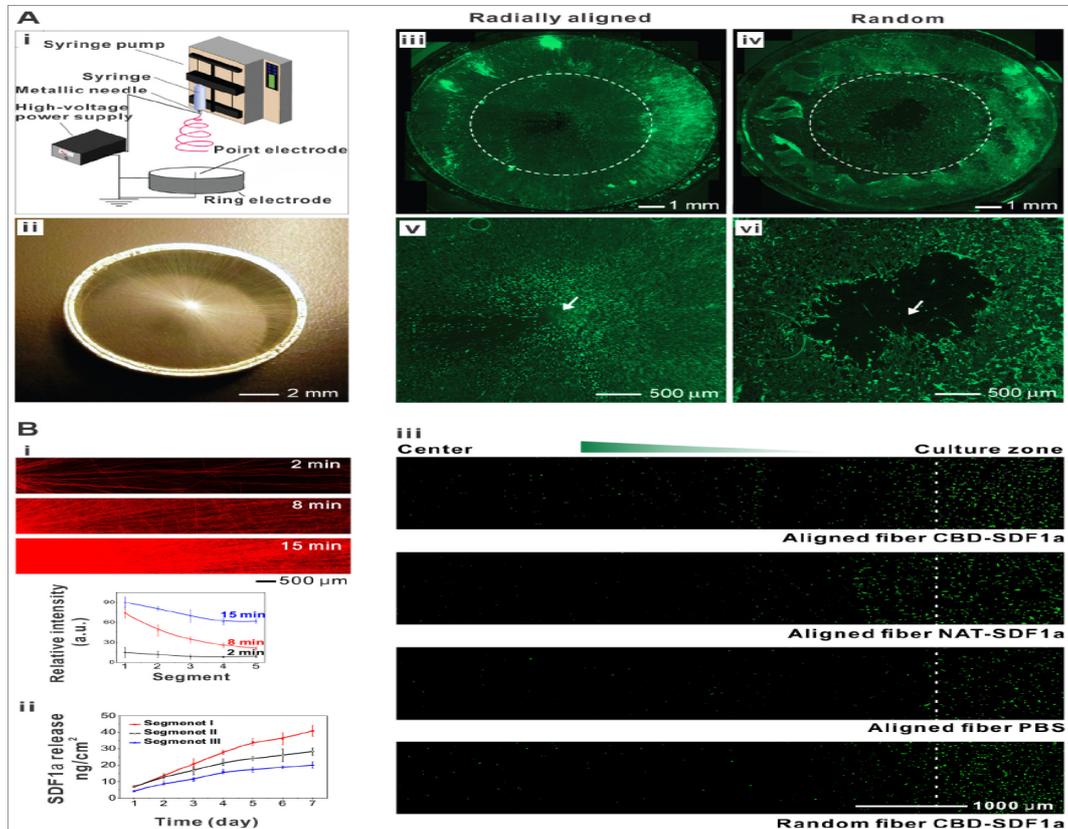


Figure 6 : Fibres électrofilées pour la migration cellulaire.²

Bien que de nombreux efforts aient été consacrés à l'induction de la migration cellulaire, très peu de succès ont été obtenus dans la réparation endogène. Il reste encore à mettre au point des échafaudages de fibres pouvant favoriser le recrutement des cellules souches. A l'avenir, les échafaudages en fibres dotés de facteurs chimiotactiques séquentiels et de facteurs de différenciation, pourraient être idéaux pour la régénération endogène. La libération séquentielle pourrait fournir des indices instructifs pour guider la migration des cellules souches vers le site de la lésion, suivie d'une différenciation spécifique, menant à la régénération tissulaire in situ.

² (A). Fibres alignées radialement comme substituts pour la fermeture de la plaie [121]. (B). Gradients continus de SDF1α incorporés dans les fibres orientées radialement pour guider les cellules souches neurales. La ligne en pointillée indique la limite des cellules souches neurales après l'ensemencement au jour 0 [127].

1.4.3 Médecine régénérative :

La médecine régénérative, qui implique normalement trois éléments majeurs : l'échafaudage, la cellule et la molécule de signalisation est prometteuse pour remplacer, réparer et régénérer les tissus défectueux ou dégénérés, suite à des blessures, le vieillissement ou des maladies.

Les échafaudages destinés aux applications de médecine régénérative doivent posséder une excellente biocompatibilité, des propriétés mécaniques appropriées et une biodégradabilité favorable. Les polymères synthétiques tels que le PLGA et le PCL sont largement utilisés en raison de leur bonne intégrité mécanique. Il a été prouvé que le PLGA possède une bonne biocompatibilité *in vitro* et *in vivo*. Cependant, pendant la dégradation du PLGA, l'accumulation de produits de dégradation acides (acide lactique et acide glycolique) entraîne une diminution du pH dans les tissus environnants, ce qui peut provoquer des réactions inflammatoires *in vivo* [128]. En comparaison, les matériaux naturels tels que le collagène, la gélatine et le chitosan présentent des propriétés biocompatibles supérieures, mais avec des propriétés mécaniques beaucoup plus faibles [129]. C'est pourquoi des échafaudages hybrides ont été développés, en combinant soit des polymères synthétiques et naturels, soit des polymères synthétiques/naturels avec des particules inorganiques. Par exemple, l'incorporation de particules nano-apatitiques dans des fibres électrofilées à base de PLGA a amélioré leur biocompatibilité grâce à la neutralisation partielle des produits de dégradation acides [130].

Outre leur bonne biocompatibilité, leurs propriétés mécaniques et leur capacité de biodégradation, les échafaudages doivent offrir une bioactivité élevée pour la régénération des tissus. Comme il a été susmentionné, les fibres électrofilées pourraient reproduire l'architecture tissulaire et nanofibrillaire de la MEC et la réponse cellulaire régulatrice, qui ont été largement examinées en médecine régénérative.

Sont présentés, ici, plusieurs exemples d'utilisation des fibres électrofilées pour la médecine régénérative.

1.4.3.1 Peau :

Les patients souffrant de brûlures étendues, de traumatismes et de plaies chroniques doivent souvent subir une greffe de peau. La greffe de peau en filet autologue reste le « gold

standard » [131-132]. La médecine régénérative a permis la mise au point d'un grand nombre de substituts dermiques. Parmi eux, les échafaudages 3D en fibre, avec des structures poreuses ouvertes et une grande élasticité, sont particulièrement adaptés à la cicatrisation des plaies, car ils peuvent se rapprocher de la structure du derme collagénique [133-134]. Chen *et al.* (2017) [135] ont passé en revue les avancées des fibres électrofilées pour la cicatrisation des plaies. Plusieurs études, liées à l'utilisation des fibres électrofilées pour la création de substituts dermiques artificiels, ont été réalisées.

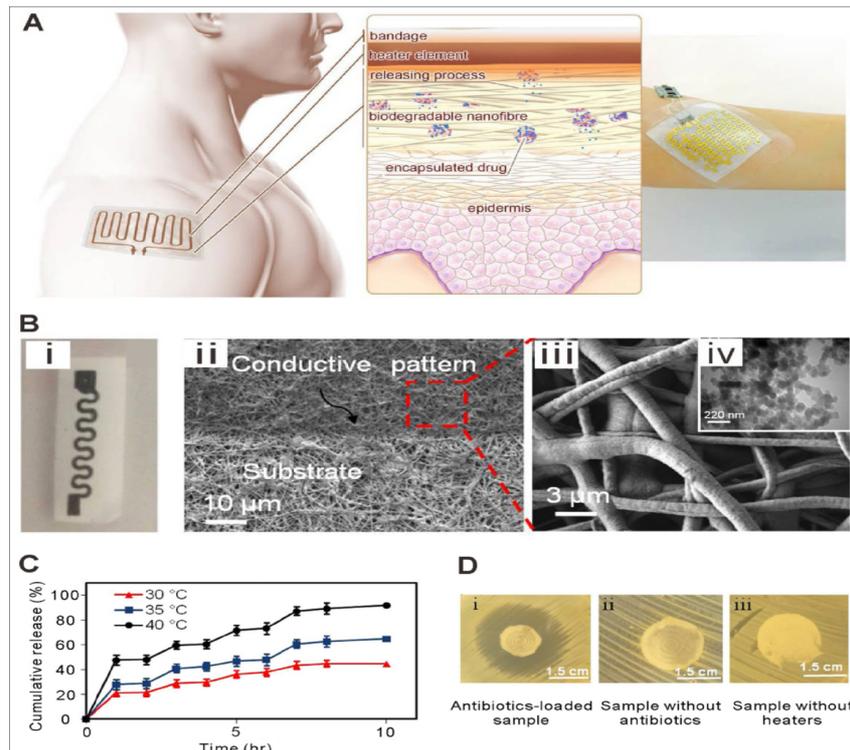


Figure 7 : Plate-forme nanofibreuse avec réchauffeur flexible intégré, pour l'administration de médicaments à la demande, dans la croissance de peau pour la réparation des brûlures et des plaies.³

Sheikh *et al.* (2015) [136] ont fabriqué des échafaudages 3D en fibroïne de soie électrofilée, présentant une porosité élevée qui peuvent faciliter l'infiltration des fibroblastes dermiques, ce qui pourrait ressembler au derme.

³ (A). Représentation schématique d'un bandage typique avec chauffage et électronique intégrés. (B) Substrat nanofibreux de poly(sébacate de glycérol)/poly(caprolactone) (PGS/PCL) contenant des nanoparticules thermo-réactives et un dispositif de chauffage technique. (C). Libération à la demande de céfazoline par stimulation thermique cyclique à différentes températures. (D). Activité antimicrobienne contre les bactéries des fibres hybrides chargées de céfazoline à 38 °C [140].

Dans une autre étude, Xie *et al.* (2017) [137] ont tenté de mettre au point des supports de tissus cutanés en 3D, en combinant des tissus cutanés broyés et des échafaudages en fibre de PCL/gélatine, avec un réseau de pores distribués.

Le défi de cette peau est d'améliorer le taux de néovascularisation, d'accélérer la ré-épithélialisation et de réduire la contraction de la plaie et la formation de cicatrices [138].

L'administration de facteurs de croissance ou de cellules souches, à partir d'un échafaudage de fibres pourrait accélérer la vascularisation et retarder la réponse immunitaire pour réduire la contraction à court terme et la fibrose à long terme. L'incorporation d'agents thérapeutiques dans les échafaudages de fibres pourrait favoriser la cicatrisation tardive et protéger la plaie contre l'infection [139].

Tamayol *et al.* [140] ont créé un pansement de fibres, avec libération d'antibiotiques contrôlable thermiquement et à la demande (Fig. 7. A). Ce pansement est composé de fibres de poly(sébacate de glycérol)/PCL enrobées de Zinc (Zn) et contenant des nanoparticules thermo-réactives (Fig. 7. B) chargées en médicament.

1.4.3.2 Tissu nerveux :

En raison de la capacité de régénération limitée du système nerveux de l'adulte humain, la réparation des lésions nerveuses périphériques importantes demeure un défi, et la réparation du système nerveux central est encore plus difficile. Les fibres électrofilées représentent une classe attrayante de matériaux pour la réparation/régénération nerveuse [141]. Par rapport aux fibres aléatoires, les échafaudages composés de fibres alignées sont plus favorables à l'ingénierie tissulaire neuronale, en raison d'une plus grande orientation de l'excroissance neuritique⁴ et de la régénération axonale dans la direction de l'alignement des fibres [141-142].

De plus, la stimulation électrique au travers d'échafaudages de fibres conductrices peut favoriser la croissance neuritique à partir des ganglions rachidiens (Fig. 8. A) [143].

Au-delà du guidage de contact et de la propriété électriquement conductrice, la fonctionnalisation des fibres avec des molécules bioactives telles que ; des protéines de la MEC (p. ex. laminine et fibronectine), les peptides (p. ex. IKVAV), les facteurs de croissance (p.

⁴ Neurite : tout prolongement du corps cellulaire d'un neurone.

ex. facteur neurotrophique dérivé du cerveau et facteur de croissance du tissu nerveux), les anticorps visant les molécules inhibitrices dans le milieu extracellulaire inhospitaliers et les petites molécules (p. ex. paclitaxel⁵), est capable de fournir une fonction biologique robuste en régénération nerveuse [141].

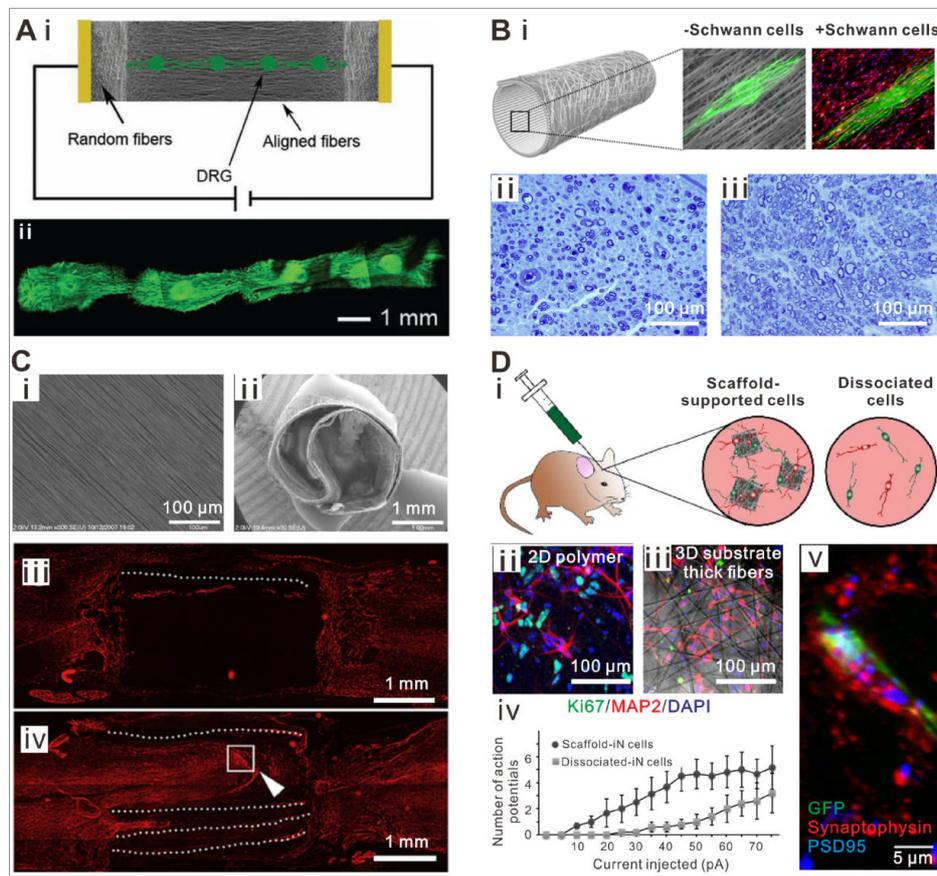


Figure 8 : Echafaudages en fibres électrofilées pour la régénération/réparation des nerfs.⁶

Des conduits de guidage nerveux à base de fibres électrofilées ont été étudiés pour réparer le système nerveux périphérique [144]. Le conduit de fibres chargé de cellules de Schwann pourrait protéger efficacement la germination des fibres nerveuses et le résultat moteur.

⁵ Paclitaxel : Le paclitaxel est une petite molécule produite par certaines espèces d'ifs.

⁶ (A). Les fibres alignées ont amélioré la croissance des neurites [143]. (B). Conduits de guidage neural (NGC) [144]. (C). Échafaudage en fibres alignées pour une section complète de la moelle épinière. (i) Fibres PLLA alignées [145]. (D). Des échafaudages fibreux ensemencés de cellules souches pour le traitement des maladies neurodégénératives [147].

La réparation du système nerveux central, comprenant la moelle épinière et le cerveau, est plus difficile. Un conduit composé de fibres alignées a été utilisé pour réparer une section complète de la moelle épinière, et il a été démontré que les fibres alignées favorisaient une régénération axonale caudale sur une plus longue distance que les fibres aléatoires et les films (Fig. 8. C) [145].

Wang *et al.* (2012) [146] ont démontré que les échafaudages en fibre PCL fonctionnalisées avec un facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales (GDNF), amélioraient la survie, l'intégration et la croissance neuritique des cellules souches neuronales après implantation dans le parenchyme cérébral. Une étude pionnière rapportée par Carlson *et al.* (2016) [147] a présenté la conception d'échafaudages en fibre 3D comme substrats pour la génération in situ de neurones humains reprogrammés à partir de cellules iPS et leur transplantation dans le cerveau (Fig. 8. D).

Tous ces travaux de recherche fournissent des informations précieuses sur l'utilisation des échafaudages de fibres dans le traitement des défauts des nerfs périphériques et de la moelle épinière. Cependant, leurs applications dans le traitement du système nerveux central restent largement inexplorées et se heurtent encore à de grands obstacles dans la réalisation de la récupération fonctionnelle. À l'avenir, une meilleure compréhension du mécanisme de reconstruction des circuits neuronaux et de transduction du signal permettra de mieux comprendre l'ingénierie des échafaudages et la réparation des lésions nerveuses.

1.4.3.3 Tissu cardiaque :

L'infarctus du myocarde (IM), principale cause de l'insuffisance cardiaque, entraîne la perte de jusqu'à 1 milliard de cellules cardiaques et un dysfonctionnement contractile en raison d'un remplacement par un tissu cicatriciel fibreux [148]. L'émergence des échafaudages en fibres électrofilées pour l'ingénierie du tissu cardiaque a fourni une stratégie pratique pour le traitement du myocarde dysfonctionnel [149-150]. Les structures des échafaudages en fibres sont cruciales pour le fonctionnement des tissus cardiaques régénérés. Par exemple, en utilisant des échafaudages de fibres PGS/gélatine alignées, des améliorations considérables ont été réalisées [151]. De plus, des échafaudages avancés présentant une anisotropie bien définie, peuvent guider

l'organisation anisotrope des cellules cardiaques et présenter une contractilité synchrone spontanée et prolongée [152].

Les patches en fibres de PCL/gélatine électrofilées, chargés de cellules souches présentent un grand potentiel pour le traitement de l'infarctus du myocarde, entraînant une cardiomyogenèse et une angiogenèse dans les régions lésées et améliore les fonctions cardiaques [153]. Malgré l'efficacité de la thérapie cellulaire, le mauvais couplage des cellules greffées avec le myocarde de l'hôte entrave leurs communications électriques et la fonction cardiaque. A cet égard, des patches en fibres polyaniline (PANI)/PLGA, électrofilées conductrices ont été fabriqués pour intégrer la conductivité électrique dans la greffe [154].

De plus, un patch multifonctionnel hybride en fibres PCL/gélatine électrofilées avec intégration d'un dispositif de maillage électronique flexible pour la stimulation électrique, la libération déclenchée de biomolécules et la détection de l'activité électrique a été développé (Fig. 9. A) [155]. Ce patch cardiaque pourrait non seulement, permettre de surveiller l'état de santé du patient, mais aussi de déclencher à distance les processus de régénération.

Les patches cardiaques artificiels ont fait un pas en avant dans la reconstruction de tissus cardiaques fonctionnels. Toutefois, de nombreux efforts sont encore nécessaires pour améliorer leurs fonctions. Tout d'abord, les techniques de pointe pour la production des échafaudages en fibres électrofilées en 3D sont utiles pour concevoir des patches cardiaques en 3D. De plus, la taille des pores plus large des échafaudages en fibres 3D permettrait une meilleure infiltration des cellules, et une meilleure perfusion des substances nutritives, ce qui favoriserait une distribution homogène des cellules sur l'ensemble du patch, et ainsi une meilleure contraction synchrone. Deuxièmement, il existe une demande urgente pour la mise au point de patches hybrides en fibres, hautement extensibles et mécaniquement stables. Enfin, outre la démonstration *in vitro*, d'autres études *in vivo* sont nécessaires pour tester leur compatibilité et leur performance dans les modèles animaux. À l'avenir, les progrès réalisés dans les échafaudages 3D en fibres électrofilées, les systèmes d'administration de médicaments, les dispositifs électroniques flexibles et le recrutement de cellules souches endogènes accéléreront l'application clinique des échafaudages en fibres électrofilées dans la réparation des tissus cardiaques humains.

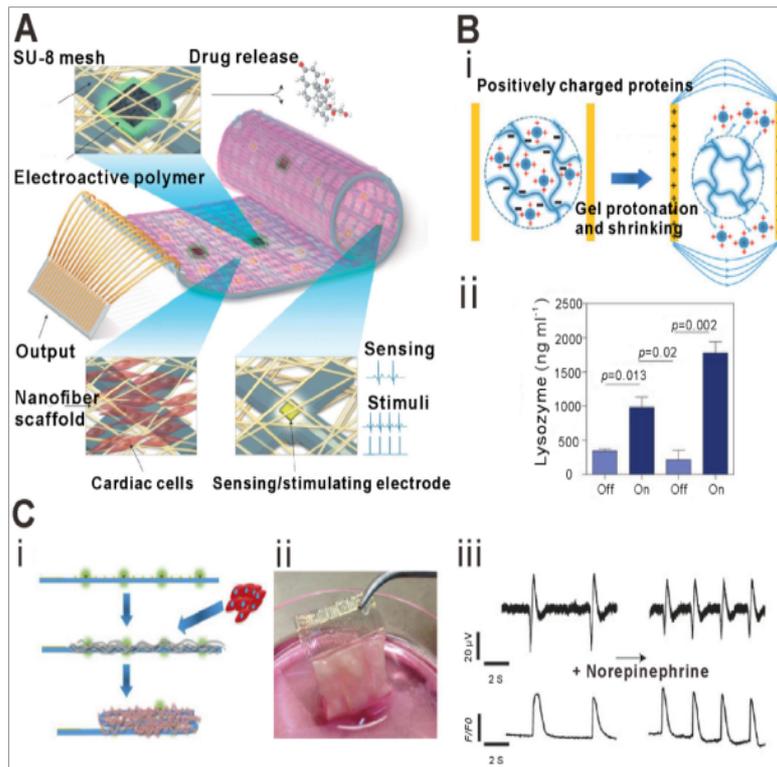


Figure 9 : Patch cardiaque hybride en fibre électrofilées avec électrode de libération de médicament pour la surveillance et la régulation des fonctions tissulaires.⁷

1.4.3.4 Tissu cartilagineux :

Le cartilage, un tissu unique sans vaisseaux sanguins, a une capacité de réparation intrinsèque minimale [156]. Les approches cliniques actuelles concernent l'implantation autologue de chondrocytes et la technique de « microfracture » ; qui consiste en une stimulation de la moelle osseuse [157]. L'ingénierie tissulaire est également employée pour la réparation du cartilage en vue d'améliorer les résultats cliniques [158]. Parmi les divers biomatériaux, les hydrogels ont fait l'objet de vastes recherches et certains produits ont même fait l'objet d'essais cliniques [159]. Cependant, les inconvénients des hydrogels sont ; leurs propriétés mécaniques relativement faibles et leur faible capacité à imiter l'organisation zonale du cartilage naturel [160]. Comme alternative aux hydrogels, les échafaudages électrofilés ont acquis une attention croissante, en raison de leur biomimétisme de l'architecture des MEC natives et de leurs meilleures propriétés mécaniques.

⁷ (A). Représentation schématique du concept de patch cardiaque microélectronique. (B). Libération à la demande de biomolécules. (C) Formation d'un patch cardiaque microélectronique [155].

Parmi eux, les hydrogels électrofilés sont prometteurs. Par exemple, des hydrogels d'AH électrofilés avec des densités de réticulation intrafibres variées, fonctionnalisés avec des RGD ont été fabriqués, offrant mécanique ajustable et adhésion cellulaire. Ces hydrogels en fibres d'AH se sont avérés soutenir la croissance des CSMs et diriger leur chondrogenèse [102]. Une autre approche intéressante a été rapportée pour concevoir des hydrogels en fibres électrofilés renforcés, en empilant les fibres avec des hydrogels ou en intégrant des fibres aux hydrogels [161-162].

La récente innovation dans la construction de cartilage a été de concevoir des échafaudages en fibre électrofilées hautement organisées, pour imiter les couches distinctes du cartilage naturel [163].

Plus récemment, une nouvelle classe d'échafaudages 3D en fibres super-absorbantes a été développée par lyophilisation de courtes dispersions de fibres électrofilées [164]. Ce type d'échafaudage 3D en fibres électrofilées représente un sérieux candidat pour la régénération du cartilage puisqu'il combine les caractéristiques uniques d'une teneur élevée en eau, et de la structure en fibres dans le fibrocartilage.

Les orientations futures pourraient envisager l'incorporation de signaux biologiques spatiaux dans les échafaudages 3D pour améliorer la régénération du cartilage spécifique à chaque zone. Une approche plus pratique pourrait combiner la technique de microfracture et des fibres électrofilées qui pourraient éluer séquentiellement différentes molécules pour améliorer le recrutement et la différenciation chondrogénique des cellules souches endogènes.

1.4.3.5 Tissus tendineux / ligamentaires :

Le tendon et le ligament sont constitués de tissus conjonctifs fibreux denses reliant le muscle à l'os et l'os à l'os, respectivement [165]. Les deux tissus sont constitués principalement de fibrilles de collagène de type I en disposition parallèle, permettant ainsi la transmission efficace de la force contractile pour favoriser le mouvement [166]. La fabrication d'échafaudages en fibres électrofilées bien alignées à forte résistance mécanique constitue la première étape pour imiter la structure anisotrope et les propriétés mécaniques des tissus tendon/ligament [167].

Il est intéressant de noter que dans les tissus tendineux/ligamentaires naturels, les fibrilles de collagène alignées possèdent une structure en sertissage caractéristique,

servant d'amortisseur ou absorbeur de chocs pendant l'étirement [168]. Par conséquent, les échafaudages de fibres alignées avec une fonction de sertissage ont été préparés par traitement avec un plastifiant (p. ex. éthanol pour fibres PLA) [169] ou chauffage à une température supérieure à la température de transition vitreuse du polymère (T_g) [170]. Les échafaudages tels que fabriqués présentaient un module de Young proche de celui du ligament croisé antérieur humain [170].

Dans une autre étude, Wu *et al.* (2017) [171] ont fabriqué des échafaudages en fibre 3D par tissage de fils en nanofibres. Les échafaudages possédaient une microstructure alignée, une taille de pore plus grande pour l'infiltration cellulaire et des propriétés améliorées, comparables à celles des tissus tendineux naturels humains. De plus, grâce à la stimulation mécanique, les cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux (HADMSC), les ténocytes humains (TH) et les cellules endothéliales des veines ombilicales humaines (HUVEC) ont favorisé la sécrétion de collagène et la différenciation ténogénique par culture dynamique. De plus, les cellules souches pluripotentes humaines induites (hiPSCs) peuvent servir de source cellulaire prometteuse pour la réparation des tendons [172].

Jusqu'à présent, les échafaudages en fibre électrofilée peuvent fournir des repères topographiques et biologiques, ainsi qu'une résistance mécanique initiale suffisante pour la réparation du tendons/ligaments. Cependant, la détérioration à long terme des propriétés mécaniques reste un obstacle à la réussite de la réparation du tendon/ligament. D'autres travaux futurs devraient faire la lumière sur la façon de remplir les exigences mécaniques élevées, incluant la tension, la compression et la force de cisaillement dans une utilisation à long terme.

1.4.3.6 Tissu osseux :

Malgré le potentiel élevé de la régénération osseuse, le traitement des défauts osseux importants demeure un défi clinique en raison de l'ablation de tumeurs, des interventions chirurgicales traumatiques et des maladies osseuses liées à l'âge [173].

Les échafaudages bioactifs/résorbables en fibres électrofilées ont été largement étudiés pour la régénération osseuse [174]. Inspirée par la composition native du collagène et de l'hydroxyapatite, l'utilisation de polymères naturels avec des minéraux a été considérée

comme idéale pour l'ingénierie des tissus osseux [175]. L'incorporation de nanoparticules d'hydroxyapatite dans les fibres via l'électrofilage mixte offre un moyen simple d'obtenir des échafaudages mimant l'os [176].

La minéralisation de surface offre une autre approche simple pour le développement d'échafaudages hybrides en fibres polymère (PCL)/phosphate de calcium [177]. En utilisant cette méthode biomimétique, il est possible de former de l'apatite ressemblant à de l'os de faible cristallinité et de taille nanométrique sur la surface des fibres électrofilées [178]. De plus, la minéralisation des fibres électrofilées peut améliorer considérablement leurs propriétés mécaniques [179].

Parallèlement, les fibres de verres bioactifs sont très prometteuses pour l'ingénierie tissulaire osseuse puisqu'elles sont résorbables, forment aisément une couche d'hydroxy-carbonate apatite et sont exploitables pour l'administration de médicaments [180]. De plus, les fibres de verre ont été dopées avec des oligo-éléments pour favoriser l'ostéogenèse et l'angiogenèse [181].

L'immobilisation de médicaments thérapeutiques, de peptides ou de facteurs de croissance sur les échafaudages en fibres électrofilées, s'est avérée des plus gratifiantes [182]. La récente avancée dans la fabrication d'échafaudages 3D en fibres électrofilées est particulièrement favorable à la réparation des défauts osseux [183].

Parallèlement à ces progrès, les échafaudages en fibres électrofilées aux propriétés mécaniques et biologiques appropriées sont toujours en cours de développement. Par exemple, les échafaudages en fibres devraient être capables de confiner et d'abaisser la dose de BMP2 (Bone Morphogenetic Protein 2) libérée dans la zone de défauts osseux car l'utilisation clinique actuelle du BMP2 entraîne des effets secondaires [184].

1.4.4 Fibres électrofilées avec activité antibactérienne :

L'électrofilage peut être aussi utilisé pour fabriquer des membranes ultrafines avec une activité antibactérienne. Zhu *et al.* (2016) [185] ont fabriqué des membranes en fibres de polyuréthanes (PU), où l'ion imidazolium était immobilisé de façon covalente à la surface, pour exercer une activité antibactérienne. Leur étude a démontré que les membranes présentaient 4.6 et 3.8 fois plus de réduction de la croissance envers *S. aureus* et *E. coli*. que la membranes 1,4-butanediol (BDO)-PU qui ne contient pas d'ions

imidazolium. La réduction de la croissance bactérienne envers *S. aureus* et *E. coli* était la suivante (88.46 %, 91.26 %) et (19.34 %, 25.71 %) pour Bmim-PU431 et (BDO)-PU, respectivement. Cela indique que ces matériaux pourraient être utilisés comme textiles de protection, filtration et en ingénierie biomédicale.

Kara *et al.* (2016) [186] ont travaillé sur le développement de films antibactériens. Ils ont encapsulé isothiocyanate d'allyle (AITC), ayant une activité antimicrobienne naturelle, dans des fibres de PLA de taille nanométrique ou submicronique.

Dans une autre étude, Cerkez *et al.* (2017) [187] ont fabriqué une membrane en fibres de PCL électrofilées contenant des particules de chlorure d'argent. Les propriétés antibactériennes de ces membranes chargées ont été testées contre des bactéries Gram-négatives et Gram-positives, et des fonctionnalités biocides remarquables ont été obtenues avec une réduction, des bactéries *S. aureus* et *E. coli*, d'environ six logs (bactéries rendues inactives).

Ces membranes en fibres de PCL électrofilées contenant du chlorure d'argent présentées dans leur étude, posséderaient d'intéressantes propriétés et un grand potentiel pour diverses applications biomédicales, incluant les pansements pour plaies, la filtration, les échafaudages en ingénierie tissulaire, l'administration de médicaments et en tant qu'implants, néanmoins, d'autres tests tels que des tests sur la biocompatibilité et la bioabsorbabilité restent à être réalisés.

1.4.5 Couverture de stents ou endoprothèses :

Des membranes en fibres électrofilées pour recouvrir les endoprothèses vasculaires et non vasculaires sont également à l'étude [188]. Les endoprothèses à libération de principes actifs ont fait l'objet de nombreuses recherches au cours des dernières années. Les endoprothèses ou stents sont des échafaudages artificiels qui ouvrent, avec une invasion minimale, des conduits ou voies obstrués dans le corps [189].

Oh et Lee (2013) [190] ont utilisé des fibres de PLGA/PLA électrofilées comme couverture ou housse pour des endoprothèse, dans le traitement des coronopathies (maladies coronariennes). Les fibres électrofilées contenant du β -estradiol utilisées comme couverture de stent présentaient un taux élevé de prolifération endothéliale et ont montré une régulation adéquate des dérivés réactifs de l'oxygène au niveau subcellulaire.

Park *et al.* (2011) [191], dans une autre étude, ont mis au point une endoprothèse œsophagienne recouverte d'une membrane en fibres électrofilées capable d'assurer une libération prolongée du principe actif sur une période pouvant atteindre 6 jours.

1.4.6 Fibres électrofilées pour des applications dentaires :

En odontologie, l'application principale des fibres électrofilées reste l'ingénierie tissulaire et la régénération des tissus buccaux et dentaires. Divers matériaux, notamment des polymères naturels (soie, collagène, chitosan...etc), des polymères synthétiques (PLA, PGA, alcool polyvinylique, polydioxanone...etc) et des nanocomposites (mélanges d'hydroxyapatite) ont été électrofilés pour l'ingénierie tissulaire des tissus buccaux et dentaires. De plus, ces matériaux ont été utilisés pour des applications dans le domaine des biomatériaux telles que la modification de surface des implants, les nanocomposites restaurateurs et l'administration de médicaments. L'approche typique pour la régénération des tissus dentaires en utilisant des échafaudages électrofilés est illustrée schématiquement à la Figure 10 [192].

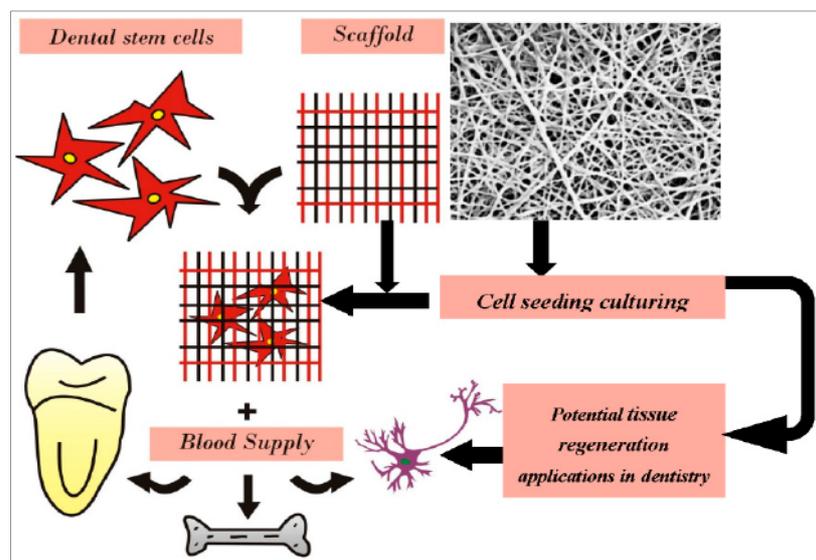


Figure 10 : Représentation schématique de l'utilisation d'échafaudages électrofilés pour l'ingénierie tissulaire de différents types de tissus buccaux et dentaires.

1.4.6.1 Régénération du complexe pulpo-dentinaire :

Divers processus pathologiques tels que les caries dentaires et les traumatismes peuvent entraîner la perte du complexe pulpo-dentinaire (la couche minéralisée et les

tissus fibreux en dessous). Par ailleurs, diverses formes de thérapies pulpaires visent à régénérer les racines des dents qui ont subi un traumatisme (*apexogénèse*). Bien que divers médicaments tels que l'hydroxyde de calcium, le sulfate de fer et les agrégats de trioxyde minéral (MTA) soient utilisés comme matériaux régénérateurs visant à régénérer le complexe pulpo-dentinaire, sur certains cas, on rencontre encore une résorption interne des dents [193-194].

Afin d'améliorer et d'accélérer les résultats de la thérapie pulpaire, les échafaudages électrofilés ont été étudiés, et cela a permis une excellente régénération à l'aide de cellules souches de la pulpe dentaire (DPSCs), qui sont une source de cellules bien établie pour la formation du complexe pulpo-dentinaire. La différenciation odontogène des DPSCs humaines sur des échafaudages en fibres de PLA électrofilées a été démontrée par une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline (ALP), l'expression des gènes marqueurs liés à la dentine et la minéralisation [195]. Des échafaudages en fibres PCL minéralisées ont favorisé la différenciation odontogène et la croissance des DPSCs humaines grâce au collagène de type I et la voie de signalisation à médiation intégrine, mais ils présentent toujours un manque en termes de propriétés mécaniques et biofonctionnelles pour des applications cliniques [196].

Afin d'augmenter les propriétés mécaniques et biologiques des fibres électrofilées, des nanoparticules telles que les nanoparticules de verre bioactifs, les nanoparticules magnétiques et les nanoparticules d'hydroxyapatite ont été incorporées dans la solution de polymères avant électrofilage. Avec l'électrofilage, il est possible de produire des composites de polymères/nanoparticules bioactives [197-198].

La thérapie endodontique (traitement du canal radiculaire) nécessite également l'administration de médicaments dans le canal radiculaire et la chambre pulpaire afin d'éliminer la microflore pathologique [199-200]. Des échafaudages en fibres électrofilées à base de collagène ou de gélatine/PCL contenant des nanoparticules de verre bioactifs ont été mis au point pour la régénération pulpo-dentinaire et ont montré une croissance accrue et une différenciation odontogène par rapport aux échafaudages à base de collagène [201-203].

L'un des plus grands avantages de l'électrofilage est peut-être sa capacité à produire des fibres avec une géométrie complexe adaptée à une application spécifique. Le but

ultime de l'endodontie régénérative est de régénérer l'histologie du complexe pulpo-dentinaire tout en restaurant les attributs mécaniques et physiques de la dent. Il serait souhaitable qu'au cours de la prochaine décennie, les fibres électrofilées, avec les échafaudages injectables et les cellules souches permettent une régénération optimale.

1.4.6.2 Régénération tissulaire guidée pour le parodonte :

Une maladie parodontale non traitée peut entraîner la destruction des tissus parodontaux et une perte éventuelle des dents [204]. La régénération des tissus parodontaux a toujours été un immense défi pour les cliniciens. Par conséquent, l'ingénierie tissulaire parodontale a pour intérêt récent, la réparation des défauts des tissus parodontaux tels que l'os alvéolaire, le ligament parodontal (LDP), et le ciment. Traditionnellement, les matériaux non résorbables tels que le polytétrafluoréthylène expansé ont été utilisés comme des membranes pour la régénération tissulaire guidée (RTG), mais ils présentaient l'inconvénient de nécessiter une intervention chirurgicale secondaire pour retirer la membrane, qui comportait souvent un risque d'infection et de gêne pour le patient.

Au lieu de cela, des matériaux naturels ou synthétiques biodégradables tels que le collagène, le PLGA, le PLA et le PCL ont été étudiés, mais ils présentent toujours un manque, aussi bien dans les fonctionnalités biologiques que dans les propriétés physiques telles qu'un mauvais contrôle de la porosité et de l'alignement de surface. L'électrofilage a émergé pour augmenter la fonctionnalité de ces membranes, ce qui permettrait d'espérer une meilleure régénération parodontale.

Les membranes de RTG en fibres électrofilées biodégradables obtenues par électrofilage ont amélioré la fonctionnalité, telle que la porosité pour attacher les cellules et l'alignement des fibres pour orienter les fibres de collagène dans la régénération du ligament parodontal tel qu'étudié pour l'attachement, la prolifération et la différenciation des cellules du ligament parodontal humaines (PDL) [205-206].

Les membranes électrofilées en collagène ont d'abord attiré l'attention dans l'application en tant que membranes RTG en raison de leurs propriétés biologiques intrinsèques telles que le potentiel de différenciation en cellules ostéoblastes [18]. Cependant, comme la plupart des sources de collagène proviennent d'animaux,

l'utilisation du collagène chez l'être humain pour des applications dentaires pourrait soulever des questions éthiques et des préoccupations sur les infections croisées. En tant qu'alternative, les membranes en polyester synthétique biodégradable ont été suggérées pour la régénération parodontale.

Des études récentes ont montré une bonne fixation et prolifération des cellules ainsi qu'une bonne formation tissulaire sur des fibres PLGA électrofilées [207], des fibres PCL électrofilées revêtues d'hydroxyapatite [208], et les membranes de soie, comme en témoigne le dépôt favorisé des composants majeurs des MEC des tissus parodontaux comme le collagène de type I et III [71-209]. Des membranes électrofilées en soie contenant du graphène [210] ou des nanoparticules d'hydroxyapatite [211] ont montré un attachement, une prolifération et la formation de tissus pour des cellules du ligament parodontal humaines (PDL) dans le ciment et les tissus osseux.

Bien que l'électrofilage ait ajouté une nouvelle perspective excitante dans le domaine de la régénération tissulaire parodontale, beaucoup de travail reste à faire pour valider l'utilisation des fibres électrofilées au stade clinique en termes de propriétés mécaniques et de propriétés biologiques *in vivo*/cliniques, mais également les mécanismes sous-jacents.

1.4.6.3 Prévention des caries :

Les caries dentaires entraînent non seulement la perte de tissus dentaires, mais aussi des ramifications systémiques. Habituellement, des traitements topiques au fluorure sous forme de rince-bouche, de dentifrices [212-213] ou de restaurations contenant du fluorure [214] et des mesures d'hygiène buccale, ont été utilisés pour prévenir les caries. Plus récemment, des fibres électrofilées ayant des propriétés anti-caries ont été étudiées. Des fibres de chitosan muco-adhésives non toxiques contenant de l'extrait de mangoustan ont montré une activité antibactérienne contre les agents pathogènes cariogènes, notamment *Streptococcus mutans* et *Streptococcus sanguinis* [215]. Ces types de membranes électrofilées pourraient être bénéfiques pour les personnes qui sont incapables de s'auto-administrer des protocoles d'hygiène buccale et peuvent être utilisés en synergie avec les méthodes existantes.

1.4.6.4 *Modification de résines composites :*

Comme la majorité des matériaux polymères, les résines composites peuvent être modifiées par l'ajout de charges nanométriques ou de fibres nanométriques [216-217]. Des nanofibres produites par électrofilage ont été incorporées pour produire des composites renforcés avec des fibres (FRCs). Il a été observé que l'incorporation de fibres de PVA renforcées par des nanotubes, dans des résines composites peut améliorer significativement les propriétés mécaniques telles que le module élastique [218]. Cependant, la dispersion des fibres entraîne une diminution du module en raison d'une liaison plus faible entre les phases fibre/résine. Le polyacrylonitrile (PAN) électrofilé et le polyamide contenant des nano-diamants ont montré qu'ils augmentaient les propriétés mécaniques des polymères composites lorsqu'ils sont fusionnés l'un avec l'autre [219], et peuvent être utilisés comme moyen pour renforcer les composites dentaires.

De même, l'incorporation de fibres de PS électrofilées à l'époxy a également permis d'améliorer les propriétés mécaniques des polymères [220]. Des fibres de nylon électrofilées contenant des nanotubes de carbone ont été utilisées avec succès pour renforcer des résines composites [221]. La production de résines composites auto-réparatrice renforcée par des nanofibres offre des perspectives intéressantes pour augmenter l'intégrité marginale et l'étanchéité des résines composites [222]. En plus d'améliorer les propriétés mécaniques et physiques des résines composites et des polymères dentaires, l'incorporation de fibres électrofilées pourrait également être utilisée pour produire des composites bioactifs et ajouter des propriétés anti-cariogènes aux matériaux de restauration. Cependant, il reste encore beaucoup à apprendre sur la liaison entre les fibres et les composites ainsi que sur les implications biologiques et *in vitro* de ces matériaux.

1.4.6.5 *Modification de surface d'implants :*

L'implant dentaire est un dispositif chirurgical qui est en contact direct avec l'os (c.-à-d. intégré à l'os ; « ostéointégré ») et qui supporte des appareils prothétiques et orthodontiques amovibles ou fixes [223]. Plusieurs matériaux (comme le titane et ses alliages) ont été utilisés pour les implants dentaires. Récemment, la zircone et des polymères renforcés tels que le polyétheréthercétone (PEEK) ont également été utilisés comme implants dentaires [217-224]. Dans le but de rendre la surface de l'implant plus

bioactive et ostéoconductrice, plusieurs méthodes de traitement de surface ont été employées [225]. Cependant, plusieurs de ces processus modifient les propriétés mécaniques ou physiques de la surface de l'implant dentaire conduisant à un faible taux de réussite.

Pour surmonter ces effets délétères des modifications de surface, plusieurs méthodes ont été proposées, mais la plupart d'entre elles prennent du temps. L'électrofilage est une autre option attrayante qui peut être utilisée pour revêtir la surface de l'implant à l'aide de matériaux bioactifs. De plus, les revêtements en fibres électrofilées ont l'avantage d'avoir une plus grande superficie de surface pour la fixation des cellules. Des implants dentaires en titane recouverts de fibres de PLGA/collagène/nano-hydroxyapatite (nHA) ont considérablement accru la prolifération cellulaire à la surface, avec par ailleurs une minéralisation accélérée [226]. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour déterminer dans quelle mesure un revêtement en fibres électrofilées adhère à la surface d'un implant dentaire par rapport aux méthodes conventionnelles.

Dans le domaine de l'ingénierie des tissus dentaires, un certain nombre de matériaux dentaires ont été mis au point pour créer un microenvironnement adapté pour la régénération dentaire. Parmi cela, les échafaudages en fibres électrofilées pourraient être une approche appropriée pour des applications dentaires en raison de la facilité de fabrication, du contrôle sur la qualité et la taille des échafaudages ainsi que l'alignement des fibres.

Les fibres électrofilées ont apporté des propriétés mécaniques et des fonctionnalités biologiques favorables aux aspects biologiques dans les applications dentaires. De plus, les fibres électrofilées ont joué un rôle polyvalent dans la libération contrôlée de biomolécules thérapeutiques (p. ex, facteurs de croissance) ou la modification avec des biomolécules adhésives (c.-à-d. la fibronectine et la séquence RGD) et ont contribué à améliorer encore la régénération dentaire. Bien qu'un certain nombre d'expériences sur des échafaudages en fibres électrofilées dans les domaines *in vitro* et *in vivo* aient été menées, d'un point de vue clinique, la personnalisation ou l'adaptation au défaut de chaque patient est encore difficile. Pour ces raisons, la pratique en clinique de ces échafaudages est encore rare. De plus, puisque la régénération des tissus dentaires peut provenir de troubles ou désordres biologiques, des études plus poussées sur les

interactions biologiques entre les fibres électrofilées et les cellules dérivées de tissus dentaires lésés sont essentielles.

Ces études menées sur les fibres électrofilées devraient aider à comprendre tous les effets biologiques. Dans le futur, des techniques plus élaborées pour personnaliser les échafaudages en fibres sont impératives, et les défauts cliniques doivent être catégorisés en plusieurs groupes pour une meilleure personnalisation du traitement.

1.5 Stratégies de modifications post-électrofilage des fibres électrofilées :

En général, l'électrofilage avec une matrice polymère unique n'est pas en mesure d'offrir suffisamment de sites actifs à la surface des fibres électrofilées pour des applications spécifiques.

Les mauvaises caractéristiques de surface des membranes en fibres électrofilées limitent leur applicabilité dans le génie biomédical et la réhabilitation de l'environnement. De ce fait, des voies ou des stratégies utiles doivent être conçues pour adapter la stabilité chimique, la résistance mécanique, la biocompatibilité, l'hydrophilie et la vitesse de dégradation des membranes en fibres électrofilées pour diversifier leurs applications.

La modification de surface de ces membranes se réfère à des processus qui permettent d'incorporer différentes fonctionnalités pour modifier et améliorer la structure chimique et les propriétés des fibres vierges. Une combinaison appropriée de molécules étrangères et du polymère constituant les fibres, peut produire de nouveaux matériaux hybrides aux performances améliorées [227].

Les membranes en fibres polymère électrofilées peuvent être fonctionnalisées soit par fonctionnalisation pré- ou post-électrofilage. Les différentes stratégies pour chaque catégorie sont schématiquement illustrées à la Figure 11 [228].

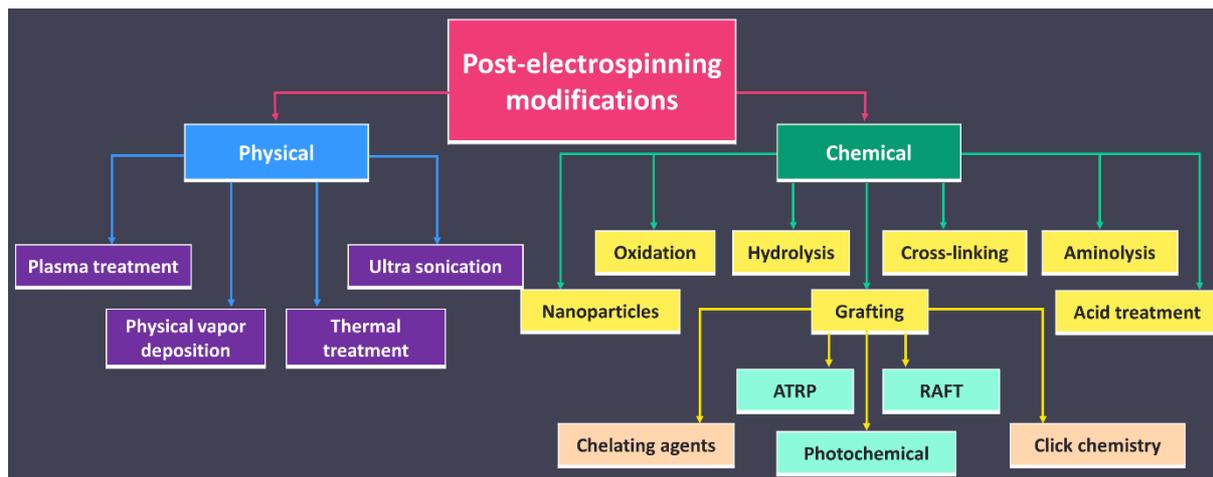


Figure 11 : Catégorisation schématique des techniques de modification post-électrofilage des membranes électrofilées.

L'incorporation d'additifs, à la solution de polymères avant le processus d'électrofilage, est qualifiée de modification ou fonctionnalisation pré-électrofilage. Cette stratégie a été largement utilisée pour modifier les surfaces ainsi que les propriétés structurales des fibres électrofilées, notamment pour les applications biomédicales. Dans certains cas, les additifs peuvent se retrouver à l'intérieur de la matrice des fibres, c'est notamment le cas des techniques visant à incorporer des molécules bioactives et autres pour des visées en libération de médicaments, par exemple.

La technique de modification pré-électrofilage ou de modification *in situ* est considérée comme la méthode la plus simple pour modifier les fibres électrofilées. Dans les techniques de modification pré-électrofilage, les additifs sont ajoutés directement à la solution de polymère à électrofiler. L'intégration d'agents de fonctionnalisation dans la solution d'électrofilage permet d'avoir de nouvelles formulations aux propriétés spécifiques. Cette technique est considérée comme la méthode la plus simple pour modifier les performances des membranes électrofilées.

Même si les techniques de fonctionnalisation pré-électrofilage offrent une stratégie simple pour la modification de membranes électrofilées, les traitements post-électrofilage sont préférés en raison de leur capacité à doter la surface de fonctionnalités spécifiques.

Le traitement de surface des membranes en fibres électrofilées après électrofilage est connu sous le nom de modification post-électrofilage. Cette stratégie est largement préférée en raison de son efficacité pour la modification spécifique de la surface des

membranes [229]. De nombreuses catégories de fonctionnalisation post-électrofilage que ce soit physiques ou chimiques sont connues. Elles sont expliquées dans cette partie.

1.5.1 Méthodes physiques :

Le traitement au plasma, le dépôt en phase vapeur par procédé physique, les traitements thermique ou par ultrasons sont les plus courants parmi les techniques de fonctionnalisation physiques [228].

1.5.1.1 Le traitement au plasma :

Le traitement au plasma est une technique de modification post-électrofilage non spécifique, généralement utilisée pour adapter les propriétés de surface des membranes électrofilées. L'unique avantage du traitement au plasma est qu'il modifie la composition chimique de la surface sans altérer les caractéristiques du matériau. Des groupements fonctionnels chimiquement réactifs peuvent être introduits à la surface des fibres après un traitement au plasma. Le traitement au plasma est principalement utilisé pour adapter l'adhésion, la rugosité et les propriétés de mouillabilité de la surface [230]. Cependant, bien que le traitement au plasma présente beaucoup d'avantages, il présente quelques inconvénients, comme sa nature non spécifique, qui se traduit par la difficulté à obtenir une surface monofonctionnelle avec un seul type de groupements. Cela conduit à la génération d'un nombre significatif de plusieurs groupements fonctionnels à la surface de la membrane traitée [231].

1.5.1.2 Dépôt en phase vapeur par procédé physique :

Le dépôt en phase vapeur est le terme général utilisé pour représenter le revêtement de surface. Il s'agit du revêtement de la surface des membranes électrofilées par une couche mince inorganique [232]. Les propriétés telles que la stabilité thermique, la résistance mécanique, la morphologie de surface, la biocompatibilité et la conductivité électrique des membranes traitées sont affectées par ce procédé. Même si le revêtement par dépôt en phase vapeur peut apporter une amélioration significative dans diverses propriétés, cette stratégie de modification est la moins discutée sur les travaux de recherches récents.

1.5.1.3 Modification par traitement thermique :

Le traitement thermique des membranes électrofilées est principalement utilisé pour améliorer la distribution de la taille des pores et les propriétés mécaniques. Le recuit, le pressage à chaud et l'hydrothermal sont les principales catégories des techniques de traitement thermique.

1.5.1.4 Traitement aux ultrasons :

Sawawi *et al.* (2013) [233] ont démontré que l'ultrasonication est la meilleure méthode pour la scission ou le fractionnement des fibres électrofilées en fibres courtes, dans des conditions de traitement appropriées (Fig. 12). La scission des fibres électrofilées par le procédé d'ultrasonication est à ses débuts. Un examen approfondi et des futurs développements sont nécessaires dans ce domaine particulier pour explorer toutes les applications éventuelles.

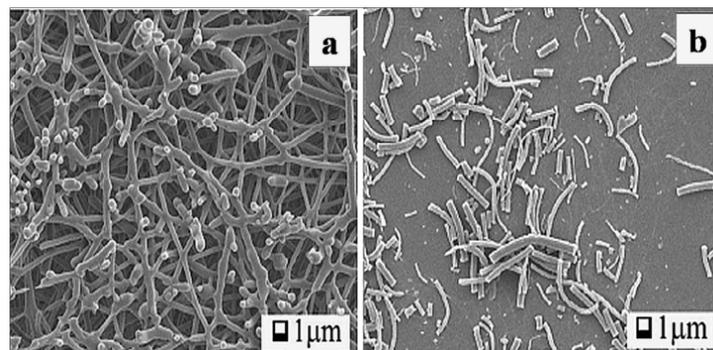


Figure 12 : Micrographies MEB montrant la morphologie des fibres de PLLA électrofilées irradiées par UV (a) avant et (b) après traitement par ultrasons. Le processus de scission produit des fibres courtes individuelles.

1.5.2 Méthodes chimiques :

Même si les modifications physiques sont courantes, elles sont toujours associées à plusieurs inconvénients. Le traitement au plasma produit un mélange de groupements fonctionnels à la surface de la membrane et en limite sa spécificité. Le dépôt en phase vapeur par procédé physique se limite au revêtement inorganique sur des fibres électrofilées. Dans certains cas, l'attachement d'un groupement actif n'est pas durable. Le traitement thermique prolongé peut endommager la morphologie des fibres.

L'ultrasonication n'a eu pour seul but que de fractionner les fibres. Toutes ces observations révèlent que les traitements physiques ne sont pas assez efficaces pour modifier les fibres électrofilées situées en profondeur dans les membranes.

Les traitements chimiques peuvent surmonter ces problèmes. C'est la stratégie la plus adaptée et la plus largement utilisée en raison de l'étendue de son applicabilité et de son efficacité. Elle peut doter la membrane à sa surface de nombreux groupements fonctionnels réactifs. Plusieurs méthodes chimiques par voie humides sont connues pour la modification ou la fonctionnalisation des fibres polymères électrofilées [234].

De plus, par rapport aux technologies de modifications post-électrofilage physiques, les traitements chimiques post-électrofilage semblent meilleurs, en raison de la disponibilité de diverses stratégies telles que le greffage, l'oxydation, l'hydrolyse, la réticulation et l'aminolyse. Récemment, la modification par chimie « click » semble également être une technique moderne et prometteuse.

En raison d'une plus large acceptabilité, les modifications de surface par des nanoparticules semblent également être une catégorie majeure.

1.5.2.1 Greffage :

Le greffage est une technique de modification chimique de la surface dans laquelle une chaîne polymère ou d'autres groupements chimiques vont être greffés sur les substrats électrofilés par une liaison chimique. Principalement, le greffage chimique peut être effectué de deux manières différentes.

La première catégorie consiste à utiliser la technique du « Grafting from » (greffage direct sur surface) en fixant un agent de transfert sur les membranes électrofilées. Dans ces conditions, le greffage est réalisé par une polymérisation radicalaire contrôlée, comme la polymérisation radicalaire par transfert d'atomes (ATRP) et la polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (RAFT). Dans cette catégorie de greffage, on peut également réaliser le « grafting from » en utilisant des irradiations UV qui produisent des radicaux libres en surface et permettent d'initier la polymérisation directement en surface [235].

La deuxième méthode consiste en l'introduction d'un polymère ou d'un groupement chimique sur la surface de la membrane électrofilée en utilisant des agents chélatants ou par l'intermédiaire de réactions chimiques de type « click ».

1.5.2.1.1 Greffage initié par des radicaux ou « Grafting from »:

Dans les méthodes de greffage de surface initiées par des radicaux libres, les initiateurs produisent des radicaux libres à la surface de la membrane électrofilée. Les sites de radicaux libres générés réagissent avec des monomères pour former des copolymères greffés.

Récemment, la modification de surface des membranes électrofilées par ATRP a suscité une attention considérable dans différents domaines comme la fabrication de membranes de filtration ou l'immobilisation de biomolécules. Par exemple, Wang *et al.* (2014) [236] ont mis au point une nouvelle membrane en fibres de polyacrylonitrile (PAN) électrofilées, avec une surface modifiée par ATRP, pour l'élimination de l'acide borique à partir de solutions aqueuses.

Par ailleurs, l'une des principales limites de l'immobilisation enzymatique est le détachement prématuré des enzymes avant une action ciblée. Par conséquent, le choix du substrat approprié pour l'immobilisation des enzymes est un sujet de recherche très discuté. Oktay *et al.* (2015) [237] ont fabriqué des membranes électrofilées en PVA modifié par l'intermédiaire de l'ATRP pour obtenir un substrat pour l'immobilisation enzymatique.

La modification de surface des membranes électrofilées par polymérisation RAFT est devenue l'objectif de recherches intensives en raison de sa capacité à permettre l'adaptation de la synthèse avec des blocs, peigne, étoile et greffage en structures complexes. Demirci *et al.* (2014) [238] ont rapporté une méthode robuste pour la modification de membranes en acétate de cellulose (AC) électrofilées par polymérisation RAFT. La surface a été fonctionnalisée avec du poly[(vinyle benzyle) triméthylammonium][poly(VBTAC)] en brosses pour l'adsorption de l'ADN.

Le greffage par voie photochimique peut se faire avec ou sans la présence d'un photoamorceur. Le photoamorceur est ajouté pour favoriser la génération de radicaux libres si la lumière absorbée n'est pas capable de créer des radicaux libres par rupture de

liaison. Sans photoamorceur, les radicaux libres générés réagissent avec le monomère et produisent des copolymères greffés et diffusent à travers le milieu réactionnel [239].

Les possibilités de fonctionnalisation des fibres électrofilées par polymérisation RAFT ou par greffage photochimique ont été discutées sérieusement ces dernières années. Cependant, les études n'en sont qu'à leurs débuts et très peu de travaux sont rapportés.

1.5.2.1.2 « Grafting to » à l'aide d'agents chélatants :

En plus de ces techniques de greffage, il y a la possibilité de greffer en utilisant des agents chélatants. Les agents chélatants sont des ligands multidentés qui ont le potentiel de former plusieurs liaisons de coordination avec les ions métalliques. L'acide éthylènediamine-tétraacétique (EDTA), l'acide nitrilotriacétique polyphosphonates (NTA), les cyclodextrines et les polymères ramifiés étaient couramment utilisés comme agents chélatants dans la modification de surface des membranes électrofilées. L'introduction d'agents chélatants sur la surface de la membrane électrofilée, peut améliorer la capacité de piégeage d'ions métalliques par la membrane électrofilée. La cyclodextrine (CD) a une grande capacité de chélation pour former des complexes d'inclusion avec des polluants organiques dans les eaux usées. La nature soluble de la CD dans l'eau peut être surmontée par greffage chimique à la surface de membrane de polymères électrofilés. Les membranes électrofilées modifiées ont montré un potentiel élevé dans les applications de filtration. Kayaci *et al.* (2013) [240] ont modifié des fibres de polyéthylène téréphtalate (PET) électrofilées avec de la cyclodextrine (CD) pour l'adsorption d'ions de métaux lourds.

En plus de l'adsorption d'ions métalliques, les membranes électrofilées avec une surface modifiée sont également utilisées pour l'élimination du CO₂. L'utilisation de fluoroalkyle silane (FAS) en tant qu'agent chélatant a été étudiée par Lin *et al.* (2016) [241]. Le groupe a fabriqué une membrane hydrofuge en polydiméthylsiloxane/polyfluorure de vinylidène (PDMS/PDVP) électrofilés modifié avec du fluoroalkyle silane (FAS) avec une excellente absorption pour le dioxyde de carbone (CO₂).

Le greffage d'agents chélatants sur la surface de membranes électrofilées est considéré comme une technique efficace pour l'extraction d'ions de métaux lourds dans le traitement des eaux usées. Comme les agents chélatants sont liés à la surface de la

membrane par des liaisons chimiques, son taux de liaison avec les ions de métaux lourds est élevé.

1.5.2.1.3 « Grafting to » par chimie click:

Récemment, la chimie click s'est révélée être une méthode de fonctionnalisation prometteuse en raison de sa grande efficacité en greffage [242]. De nombreuses études sont réalisées sur les réactions chimiques basées sur la chimie click pour obtenir des surfaces de fibres électrofilées fonctionnalisées.

Plusieurs catégories de réactions « click » telles que l'addition de Diels-Alder, réaction thiol-ène et la cyclo addition entre un azoture et un alcyne catalysée par du cuivre (copper(1)-catalyzed azide-alkyne) sont les plus communément reconnues pour la modification chimique des membranes électrofilées pour la bio-ingénierie et les applications biomédicales [243].

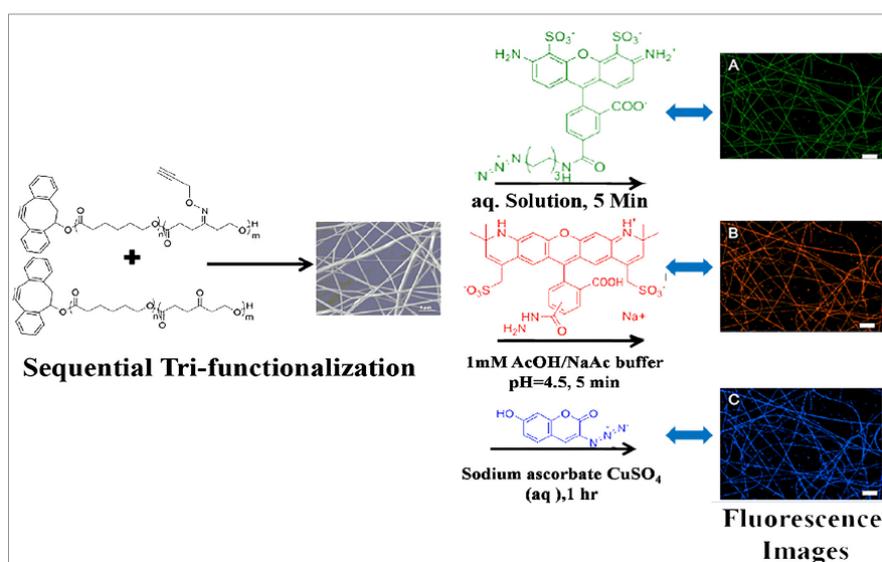


Figure 13 : Schéma illustrant le schéma de fonctionnalisation en tri-clicks d'une membrane électrofilée. Les images de fluorescence des membranes modifiées (a-c) sont la preuve d'une fonctionnalisation séquentielle réussie.

Comme exemple, Zheng *et al.* (2015) [244] ont utilisé la combinaison de trois réactions click pour la première fois, pour la fabrication de nouvelles membranes électrofilées biodégradables, fonctionnalisées par « tri-click » pour des applications biomédicales (Fig. 13). Ils ont, en outre, démontré la capacité d'un scaffold modifié à se conjuguer avec des molécules bioactives telles que les peptides, le calcium et des groupements dopamine. Ces

molécules bioactives ont été attachées à la surface des fibres modifiées et s'est avéré être une stratégie efficace pour la conjugaison de molécules bioactives à la surface de membranes électrofilées.

De nombreux échafaudages créés avec cette technique sont utilisés pour la conjugaison avec des molécules bioactives. De plus, la fonctionnalisation des membranes électrofilées basée sur la chimie click peut être modifiée pour développer des matériaux intelligents sensibles au magnétisme, au pH ou à la lumière.

1.5.2.1 Oxydation :

L'oxydation est une autre stratégie utile pour développer des groupements réactifs fonctionnels hydrophiles à la surface de membranes électrofilées. Ma *et al.* (2008) [245] ont synthétisé une membrane en fibre d'acétate de cellulose (AC) électrofilée fonctionnalisée par des protéines en tant que membrane d'affinité pour lier l'immunoglobuline. L'évaluation de la capacité de liaison avec des protéines de la membrane a montré une forte immobilisation des protéines et une forte capacité à se lier avec des protéines immunoglobulines.

Dans un autre travail, Li *et al.* (2014) [246] ont synthétisé des fibres de poly(fluorure de vinylidène) (PVDF) électrofilées, fonctionnalisées avec du Nafion par oxydation à l'ozone (O₃). La membrane électrofilée en PVDF a été soumise à une oxydation à l'ozone pour produire des sites peroxydes à la surface. Les peroxydes générés ont été utilisés pour greffer le polymère Nafion sur la surface de la membrane en PVDF électrofilé. L'incorporation de Nafion développe des voies conductrices de protons à travers les membranes en PVDF électrofilées et montre une haute performance en tant que membrane échangeuse de protons. Ainsi, l'oxydation de la membrane électrofilée sert comme stratégie simple pour introduire des groupements réactifs à la surface de la membrane. Cette technique est surtout utilisée pour convertir les fonctionnalités de surface existantes vers des compositions plus adaptées ou souhaitées.

1.5.2.2 Hydrolyse :

L'hydrolyse partielle de la surface d'une membrane électrofilée sert de méthode simple, efficace et pratique pour créer de nouveaux groupements chimiques fonctionnels

à la surface des fibres électrofilées [247]. Dans le cas des membranes à base de polyesters électrofilés, lors de l'hydrolyse alcaline, la liaison polyester est clivée et il en résulte la création de groupements fonctionnels hydrophiles $-COOH$ et $-OH$ à la surface de la membrane. En conséquence, l'hydrophilie de surface est améliorée.

Zhou *et al.* (2016) [248] ont modifié des fibres de poly(éthylène glycol)-b-poly(L-lactique-co- ϵ -caprolactone) (PELCL) électrofilées avec différents peptides. Préalablement à la fonctionnalisation avec des peptides, la membrane a été soumise à un traitement d'hydrolyse alcaline pendant 50 min. Les membranes hydrolysées ont fourni des groupements carboxyliques, qui ont servi comme moyen de fonctionnalisation et d'immobilisation pour les molécules peptidiques. Les membranes électrofilées en PELCL Modifiées ont montré une meilleure hémocompatibilité pour les greffes vasculaires.

Plusieurs travaux sont rapportés sur la modification des propriétés de surface de fibres de PCL électrofilées par hydrolyse alcaline. Mobarakeh *et al.* (2010) [249] ont étudié des membranes électrofilées fonctionnalisées, avec du Matrigel, par hydrolyse alcaline (Fig. 14).

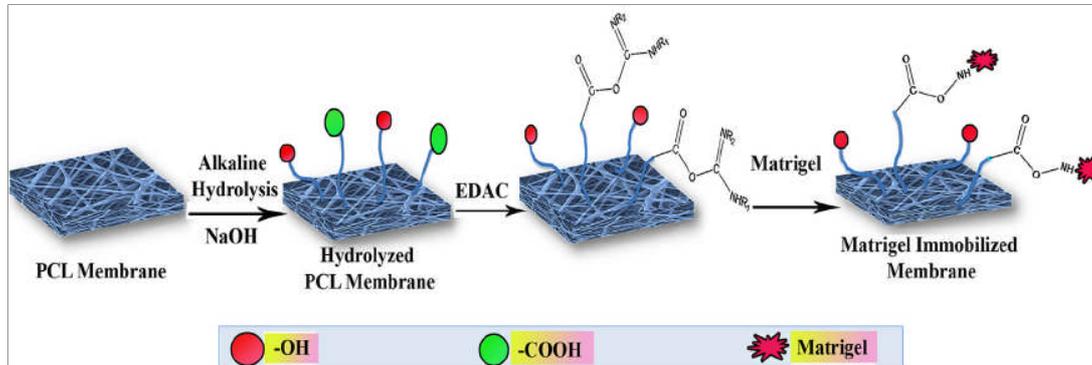


Figure 14 : Illustration schématique de l'immobilisation biologiquement pertinente du Matrigel sur une membrane PCL modifiée.

La membrane PCL électrofilée a été immergée dans une solution aqueuse de NaOH et a ensuite été soumise à une réaction de couplage avec l'hydrochlorure de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDAC) pour produire un intermédiaire réactif qui peut se lier de manière covalente avec la terminaison amino du Matrigel. Par la suite, le Matrigel a été immobilisé de manière covalente, pour d'obtenir un nouvel échafaudage en fibres PCL électrofilées fonctionnalisées avec du Matrigel pour l'ingénierie tissulaire. Les

membranes PCL modifiées présentaient une hydrophilie, une prolifération et une adhésion cellulaire accrues.

D'autres travaux traitant de cette technique de modification de surface des membranes électrofilées sont rapportées, et il apparaît clairement que l'hydrolyse alcaline est principalement axée sur la production de membranes hydrophiles.

1.5.2.1 Réticulation :

Il existe certains polymères dont l'application est limitée par une hydrophilie supérieure « super hydrophile ». Les fibres électrofilées produites avec de tels polymères doivent être stabilisées par réticulation avec des groupements chimiques appropriés. La réticulation chimique peut stabiliser la membrane en favorisant la liaison et les réactions de couplage entre les chaînes polymères. Elle peut améliorer la stabilité de la membrane dans l'eau, mais aussi les performances mécaniques des membranes. L'Azoture d'acyle, l'hexaméthylène diisocyanate, le carbodiimide et le glutaraldéhyde sont les substances les plus utilisées comme agents de réticulation. En outre, de nombreux polysaccharides modifiés sont également des agents de réticulation courants.

L'acide poly(γ glutamique) (γ -PGA) et ses dérivés sont d'excellents candidats pour de nombreuses applications biomédicales en raison de leur biocompatibilité et de leur biodégradabilité. Toutefois, la super hydrophilie, associée avec le γ -PGA électrofilé, limite ses applications. Wang *et al.* (2014) [250] ont rapporté une méthode facile pour la génération de fibres γ -PGA électrofilées qui présentaient une haute stabilité dans l'eau.

La gélatine est un biopolymère naturel qui présente un grand potentiel pour des applications en ingénierie tissulaire. Cependant, la grande hydrophilie associée aux membranes de gélatine électrofilées entraîne une désintégration rapide de la morphologie des fibres au contact de l'eau et des milieux de culture. Elle peut être surmontée par un traitement post-électrofilage avec des agents de réticulation.

Les travaux réalisés, sur la modification des membranes électrofilées avec des agents de réticulation, sont la preuve de l'efficacité de cette technique. Cela peut être une bonne approche pour adapter précisément la stabilité à l'eau des fibres électrofilées.

1.5.2.2 Aminolyse :

Parmi les différents groupements fonctionnels réactifs, les amines primaires sont considérées comme les sites réactionnels les plus prometteurs pour l'immobilisation de biomolécules. Les fibres électrofilées fonctionnalisées avec des amines sont considérées comme des candidates idéales pour des applications biomédicales en raison de leur capacité à former des liaisons covalentes avec les molécules biologiques.

En raison du temps qu'elles prennent et de la multitude des étapes des procédés, certaines stratégies ne sont pas très encouragées. Les réactions d'aminolyse constituent une solution simple à ce problème.

Dans le cas d'une surface en polyester, la réaction d'aminolyse peut entraîner le clivage des liaisons ester hydrophobes. L'un des groupements amino présents dans l'agent d'aminolyse réagit avec le carbone du carbonyle du groupement ester et laisse l'autre libre. Le groupe amino libre est alors exposé à la surface pour une future fonctionnalisation. Les agents d'aminolyse couramment utilisés sont l'éthylène diamine, la phénylènediamine, le 1,6 diaminohexane, l'hydrazine, le 1,2 diaminopropane et 1,3 diaminopropane.

Comme exemple, Srisook *et al.* (2014) [251] ont fonctionnalisé des membranes PCL électrofilées par greffage covalent pour immobiliser la 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase afin de fabriquer un nouveau catalyseur hétérogène. La surface de la membrane PCL électrofilée doit contenir des groupements fonctionnels réactifs tels que des groupements amine, carboxylique et hydroxyle pour une immobilisation correcte et efficace des enzymes à la surface des fibres électrofilées.

Le surface a ensuite été fonctionnalisé avec de l'éthylènediamine (EDA) pour introduire des groupements amine réactifs avant l'immobilisation. L'étude a indiqué que ces fibres de PCL électrofilées, avec une enzyme immobilisée à la surface, pouvait mieux tolérer les changements de pH et de température que l'enzyme libre.

D'après les travaux menés sur cette technique, il est clair que l'aminolyse produit une surface riche en amines et favorise l'immobilisation enzymatique.

1.5.2.3 *Traitement à l'acide :*

La modification des fibres électrofilées peut également être effectuée en enlevant des matériaux de la surface existante. Ces techniques modifient la surface, en éliminant les matériaux inutiles, sans altérer sa structure chimique.

Lu *et al.* (2012) [252] ont effectué un traitement simple à l'acide pour éliminer les nanoparticules de sels métalliques inorganiques de la surface d'une membrane électrofilée de polyéthersulfone (PES)/acide perfluorosulfonique (PFSA) en immergeant la membrane de l'acide chlorhydrique.

La modification par suppression ou enlèvement de matériaux existants à la surface des membranes électrofilées n'est pas d'une grande pertinence. D'autres études dans ce domaine devraient produire de nouvelles méthodes alternatives pour la modification des fibres électrofilées.

1.5.2.4 *Modifications basées sur les nanoparticules :*

La surface des membranes en fibres électrofilées fonctionnalisées avec nanoparticules métalliques est un sujet d'intérêt pour le développement de composites fonctionnels intelligents [253]. Nejad *et al.* (2015) [254] ont synthétisé des fibres électrofilées fonctionnalisées avec des nanoparticules d'argent pour évaluer la biocompatibilité ainsi que l'activité antibactérienne *in vitro* et la capacité à être utilisée dans la cicatrisation des plaies *in vivo*. Elle a été réalisée par électrofilage de poly(dopamine (méth)acrylamide-co-méthacrylate de méthyle) (MADO), suivie d'une modification avec de la dopamine et des nanoparticules d'argent.

De nombreuses études récentes ont montré que les nanoparticules de métaux nobles incorporées dans des fibres électrofilées peuvent servir comme substrat SERS, montrant une activité SERS rare et une très bonne sensibilité SERS [255].

En plus de toutes ces techniques de modification de surface, beaucoup d'autres stratégies efficaces sont également connues. La fonctionnalisation de membranes électrofilées à l'aide de techniques basées sur la nanotechnologie telles que l'impression moléculaire, le dépôt couche après couche, la technique Sol-gel et la déposition atomique sont également bien établies. Ces méthodes sont adaptées pour fournir un revêtement

fonctionnel de différents matériaux sur la surface de membranes. La technologie d'impression moléculaire permet d'introduire une fonctionnalité à la surface de la membrane, en fournissant quelques sites de reconnaissance pour certaines molécules spécifiques [256]. En technologie sol-gel, le sol utilisé peut être des composés organométalliques ou des oxydes métalliques inorganiques [256]. Dans le passé, la modification pré-électrofilage se limitait à de simples techniques de mélange.

L'évolution de la recherche dans le domaine de la modification de surface des membranes en polymères électrofilés peut s'étendre au développement de procédés modifiés qui seraient des combinaisons de plusieurs techniques connues.

1.6 Approches développées dans ce travail de thèse :

La modification de membranes électrofilées s'est révélée être une stratégie flexible pour introduire des propriétés supplémentaires et/ou améliorées sur les fibres vierges électrofilées. Le rapport surface/volume élevé des fibres électrofilées et la flexibilité d'adaptation de leurs propriétés sont les caractéristiques les plus pertinentes qui permettent de les modifier facilement. Bon nombre d'applications utiles des membranes électrofilées bénéficieraient grandement d'un traitement de surface approprié et d'une fonctionnalisation subséquente de celles-ci.

Un effort considérable est consacré à la modification des membranes électrofilées dans le but d'adapter leurs propriétés telles que l'hydrophilie/hydrophobie, la résistance mécanique, la stabilité, la distribution et la taille des pores, l'adhésion cellulaire, la prolifération, la cytocompatibilité, la capacité de filtration/adsorption et l'activité catalytique. De nombreux additifs fonctionnels sont utilisés pour modifier les membranes, c'est d'ailleurs la technique de modifications la plus rapportée. Cependant, les stratégies de modification pré-électrofilage présentent toujours de nombreux inconvénients suite à leur inefficacité à permettre d'exposer précisément les différents additifs à la surface avec précision. De ce fait, les techniques de modification post-électrofilage qui permettent de revêtir ou de fonctionnaliser la surface des membranes de façon précise et distincte sont les plus largement acceptées.

Les méthodes chimiques en milieu humide sont davantage adoptées, que les techniques de modifications physiques. Pour cela, le greffage, l'oxydation, l'hydrolyse,

l'aminolyse et la réticulation sont les techniques de modification chimique les plus largement utilisées. La modification de membranes électrofilées en utilisant des nanoparticules importante d'un point de vue commerciale s'est également révélé être un outil de fonctionnalisation chimique fructueux au cours des dernières années. Les techniques de greffage basées sur la chimie click sont également largement acceptées pour revêtir les surfaces avec des agents fonctionnels. En outre, l'abrasion de la surface des fibres électrofilées à base d'acide est également connue comme technique de modification, mais elle est la moins couramment utilisée.

Le potentiel des membranes électrofilées modifiées pour immobiliser des ligands reconnaissables par les cellules, des enzymes et pour charger des molécules médicamenteuses en vue d'une administration contrôlée de médicaments, met en évidence leur large champ d'application dans les applications biomédicales.

Cependant, les recherches incomplètes sur les paramètres de traitement, la complexité des configurations utilisées et l'absence de matériaux à usage général rend l'application des différentes fonctionnalisations documentées assez compliqué. Il en ressort que la recherche fondamentale prime sur la recherche appliquée, et que malheureusement, bon nombres de ces membranes fonctionnalisées n'arriveront peut être jamais à des applications concrètes commercialisables.

C'est dans cette optique, que l'équipe du Pr V. Migonney a mis au point le greffage de polymères d'intérêt thérapeutique tel que le poly(styrène sulfonate de sodium) (polyNaSS) sur différents biomatériaux (titane ou alliage de titane [258-267], PET [268-270] et PCL [271-275]).

Depuis plusieurs années, l'équipe LBPS a mis au point le greffage radicalaire de polymères anioniques sur les surfaces prothétiques par voie dite « thermique ». Le greffage par voie thermique s'effectue en deux étapes : activation de la surface pour créer des hydroperoxydes qui par augmentation de la température se décomposent pour créer des radicaux libres en surface. Ces derniers permettront l'amorçage de la polymérisation radicalaire du styrène sulfonate de sodium (NaSS) à partir de la surface (technique du « grafting from »). Les évaluations biologiques *in vitro* et *in vivo* des surfaces greffées de polyNaSS montrent l'amélioration sensible de l'ostéointégration et la prévention de

l'infection ce qui a conduit à l'accord de l'ANSM pour la réalisation par la société CERAVÉR d'une étude clinique multicentrique chez l'Homme (2017).

La technologie du greffage thermique du polyNaSS sur des implants de titane (et ses alliages) a été brevetée par le LBPS/UP13 et la société Ceraver a pris une licence sur ce brevet afin de pouvoir commercialiser le procédé dès la fin des essais cliniques (2 ans). Depuis, le LBPS continue à étudier et travailler sur le greffage radicalaire du polyNaSS sur diverses surfaces prothétiques afin de comprendre et d'optimiser le processus. En effet, cette innovation repose sur le greffage de polymères bioactifs à la surface du titane par amorçage thermique qui est très efficace et reproductible mais par forcément « idéal » pour une réalisation à l'échelle industrielle : le procédé (Fig. 15) est coûteux en termes de temps de polymérisation (15 h) et de quantité de réactif (monomère).

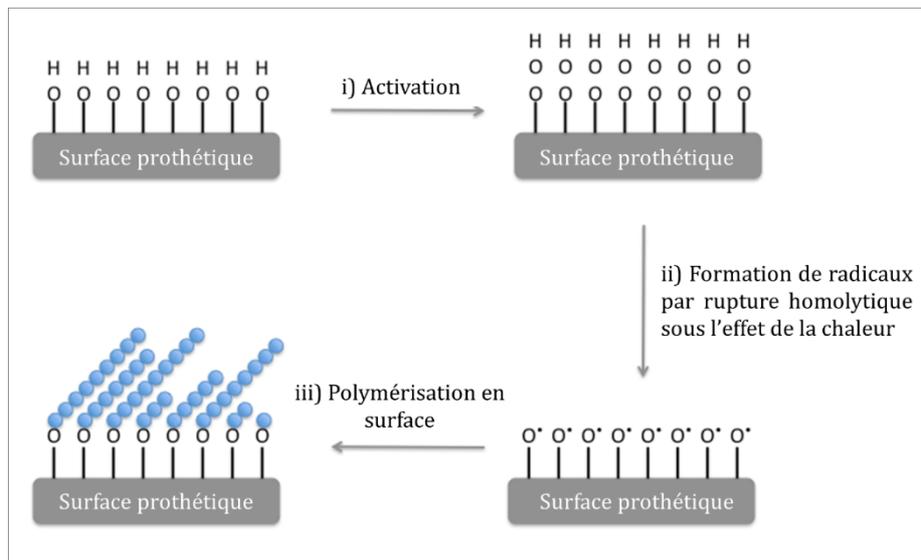


Figure 15 : Représentation schématique de la technique de « grafting from » ou greffage à partir de la surface par voie thermique.

Afin d'améliorer le procédé de greffage du polyNaSS, l'énergie apportée par la chaleur a été substituée par de l'énergie apportée par le rayonnement ultraviolet (UV). C'est la technique de greffage radicalaire du polyNaSS en utilisant les rayonnements UV. Cette technique a été mise au point et développée sur des surfaces en titane et alliages de titane [259-261] et a également fait l'objet d'un brevet LBPS/UP13 qui a été déposé par la SATT IdF Innov en août 2015 [266]. Dans ce manuscrit de thèse, nous avons utilisé cette

technique de greffage radicalaire en utilisant les rayonnements UV pour fonctionnaliser des échafaudages en fibres de PCL électrofilée.

Choix du matériau : Poly(ϵ -caprolactone) (PCL)

Les polymères biodégradables ont un très large spectre d'applications biomédicales en ingénierie tissulaire et en médecine régénérative. Les polyesters comme le PLA, le PGA, le poly(carbonate de triméthylène) (PTMC) et le PCL, constituent un groupe important de polymères biodégradables. Leur vitesse de dégradation dépend de diverses propriétés telles que la longueur de la chaîne (poids moléculaire), la cristallinité, le degré de branchement, la forme ainsi que le milieu dans lequel le polymère est introduit.

Cela peut être réalisé en utilisant différentes techniques de polymérisation, conditions de polymérisation, réactifs et monomères lors de la production du polymère final ou par modification du polymère obtenu. Ceci donne des polymères avec une large gamme de propriétés telles que la rigidité, l'extensibilité, la solubilité et les valeurs T_g et T_m (température de transition vitreuse et de fusion, respectivement).

Le PCL est un polyester biocompatible, largement utilisé pour les applications biomédicales, synthétisée par polymérisation en ouverture de cycle de monomères ϵ -caprolactone en la présence de catalyseurs cationiques ou anioniques ou par polymérisation radicalaire par ouverture de cycle du 2-méthylène-1-dioxapène [276].

Ces réactions ont été réalisées dans différentes conditions telles que la température et la durée de polymérisation, la présence, les types et les concentrations des catalyseurs, le rapport monomère/solvant, etc.

En changeant une ou plusieurs de ces variables, il a été possible de produire des PCL ayant des poids moléculaires (M_n) et des indices de polydispersité (IP) différents [277], ce qui a conduit à des différences dans le comportement de dégradation et la résistance mécanique. La solubilité du PCL est élevée dans le benzène, le tétrachlorure de carbone, le chloroforme, le cyclohexanone, le DCM, le toluène et le 2-nitropropane. Sa solubilité est plus faible dans l'acétone, l'acétonitrile, 2-butanone, le DMF, l'acétate d'éthyle et il est insoluble dans l'eau, l'alcool éthylique, l'éther diéthylique et l'éther de pétrole [278].

Le PCL est semi-cristallin à température ambiante et à la température du corps humain, sa température de transition vitreuse (T_g) est d'environ -60°C et sa température de fusion

(T_m) d'environ 60°C [278]. A température ambiante, les chaînes amorphes sont à l'état caoutchouteux, ce qui donne aux chaînes PCL une liberté de mouvement à température corporelle, ainsi cela augmente leur perméabilité pour les métabolites corporels lorsqu'elles sont remplacées dans le corps [279].

La dégradation est une propriété importante pour les matériaux utilisés dans la préparation des échafaudages pour des applications d'ingénierie tissulaire. En ingénierie tissulaire, on s'attend à ce que le taux de dégradation du matériau soit similaire à celui de la régénération tissulaire. Si la dégradation est plus lente que le taux de régénération des tissus, elle entrave la croissance des tissus et si elle est plus rapide, cela entraîne une perte de connexion entre le tissu et l'échafaudage et retarde le processus de guérison [280].

Le PCL est un polyester aliphatique semi-cristallin biodégradable, mais plus stable que les polylactides parce qu'il contient moins de liaisons esters par monomère et, par conséquent, la dégradation prend plus de temps pour que les fragments des chaînes PCL soient hydrolysés enzymatiquement dans le corps. La dégradation dépend du poids moléculaire, de la forme, la teneur résiduelle en monomère, l'autocatalyse en plus d'autres facteurs. En général, la dégradation complète du PCL prend 2 à 3 ans dans les milieux biologiques avec un changement constant du fluide interstitiel [281-283]. La dégradation enzymatique se produit par l'action de l'enzyme lipase [284]. L'enzyme lipase est présente dans le fluide interstitiel sécrété par les cellules et agit en clivant les liaisons esters du PCL [284]. Le pH du milieu a une influence sur le taux de dégradation. Dans un milieu alcalin la dégradation du PCL est plus rapide que dans un environnement acide [285]. Le produit de dégradation de cette étape est l'acide 6-hydroxycaproïque qui est libéré dans le milieu [286]. Cette molécule peut être absorbée par les cellules et subir une β -oxydation pour former des molécules de 3-acétyl CoA, qui sont par la suite métabolisées dans le cycle de Krebs [287], et qui sont éliminés par excrétion rénale. Il n'y a pas d'accumulation dans l'organisme.

Le PCL possède de nombreuses bonnes qualités faisant de lui un biomatériau. Bien que sa biocompatibilité n'est pas optimale, sa propriété caoutchouteuse, sa biodégradabilité ajustable, la facilité de former des mélanges, des composites et des copolymères en font un matériau souhaitable pour une utilisation comme matériau support en particulier pour les tissus durs, un bon matériau pour produire des échafaudages d'ingénierie tissulaire, et un matériau souhaitable pour les sutures chirurgicales et la délivrance de médicaments

en micro ou nano vésicules. De plus, la possibilité d'adapter la rugosité et l'hydrophilie de la surface permet d'obtenir des caractéristiques de surface et d'interface idéales pour les tissus [288-289]. Certains des dispositifs à base de PCL ont déjà été approuvés par la « Food and Drug Administration » (FDA) pour être utilisés chez l'homme.

II

Matériels et Méthodes

Dans ce chapitre, sont d'abord décrits les différents matériels et méthodes qui ont servi à réaliser ce travail de thèse. Il traite des différentes surfaces utilisées pour réaliser les expériences, en présentant les procédés de préparation de celles-ci. La technique de greffage par « grafting from » y ait aussi brièvement présentée. Ce chapitre détaille les différentes méthodes de caractérisation, qu'elles soient pour la caractérisation de surface ; comme la mesure d'angle de contact, la spectroscopie infrarouges à transformation de Fourier à réflexion totale atténuée (ATR-FTIR), la microscopie électronique à balayage couplée à une analyse élémentaire de surface (MEB-EDX) et la spectroscopie photoélectrique par rayons X (XPS), ou pour l'évaluation des propriétés du matériaux comme la calorimétrie différentielle à balayage (DSC), la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) et la caractérisation des propriétés mécaniques. Aussi, nous avons pris le soin d'expliquer la conception/fabrication du dispositif d'électrofilage, qui constitue le cœur de cette étude.

2.1 Elaboration des surfaces :

Le matériau retenu pour cette étude est le polymère poly(ϵ -caprolactone) (PCL). Les granules de PCL sont obtenues auprès de Sigma-Aldrich. Les surfaces utilisées sont divisées en deux séries. La première série, des films de PCL, sont obtenus par « *spin coating* », il s'agit d'un procédé de formation d'une couche mince et uniforme par dépôt d'une solution de la substance du film sur la surface plane d'un substrat qui tourne à vitesse élevée. Les échantillons relatifs à cette première série ont été utilisés pour mettre au point la technique de greffage de polymères bioactifs grâce aux irradiations UV, sur des surfaces PCL. La seconde série d'échantillons, utilisés dans la plus majeure partie de ce travail de thèse pour développer des échafaudages en fibres de PCL fonctionnalisés par le greffage de polymères bioactifs, sont des membranes en fibres de PCL électrofilées obtenues par procédé d'électrofilage.

2.1.1 Préparation des films en PCL :

Les films ont été fabriqués à l'aide d'un procédé d'enduction par centrifugation (*spin coating*) (Fig. 16). Une solution de PCL ($M_n = 45,000 \text{ g mol}^{-1}$) dans du dichlorométhane (Fisher) (60 % (p/v)) a été déposée sur une boîte de pétri en verre, puis filée pendant 30 s à 1 500 tr/min à l'aide d'un « *spin coateur* » SPIN150-v3 SPS. Les films ont été séchés à l'air toute la nuit pour éliminer le solvant, puis découpés en petits disques d'un diamètre de 14 mm. L'épaisseur des films est de $45 \pm 5 \mu\text{m}$.

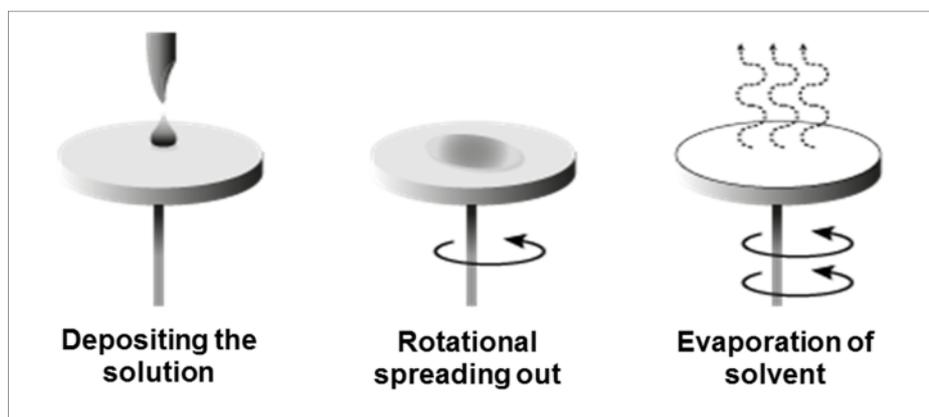


Figure 16 : Procédés de *spin coating* pour la production de films PCL.

2.1.2 Développement d'un dispositif d'électrofilage au sein du laboratoire LBPS :

Pour les besoins de ce travail de thèse, nous avons développé et mis en œuvre au laboratoire un appareil d'électrofilage « *fait-maison* ». Cette étude a permis d'introduire une nouvelle technique au sein du laboratoire LBPS.

Pour développer un dispositif d'électrofilage efficace et répondant à des besoins de recherche, la démarche entreprise s'est basée sur une approche scientifique en s'appuyant sur la bibliographie. Le développement de cet appareil est passé par plusieurs étapes, en l'améliorant au fur et à mesure de sa prise en main de manière à pouvoir faire varier les paramètres de filage de façon large.

Nous avons commencé par un système avec éjection horizontale du jet de polymère chargé. En raison de cette configuration, plusieurs problèmes ont été observés, ce qui a nécessité la modification du système. Le premier point qui a posé problème a été l'influence de la gravité sur la trajectoire du jet de solution. Le second point a été le besoin de mobilité des éléments par rapport aux autres (polyvalence de filage du dispositif).

Suite aux problèmes rencontrés avec ce système à éjection horizontale, un second système a été conçu. Il a été réalisé de sorte à avoir un trajet du jet vertical du haut vers le bas, avec comme collecteur, une plaque métallique fixe reliée à la terre. Ce système a apporté, plus de degrés de liberté au cours du filage et une homogénéité des fibres non-tissées améliorée.

Par rapport au premier système (horizontal), le second a permis de produire des fibres électrofilées de polymères beaucoup plus homogènes en diamètre. Au vu des améliorations obtenues avec la configuration du second système, il a été décidé de concevoir un prototype final de filage vertical beaucoup plus polyvalent et d'y intégrer dans le cahier des charges des paramètres de sécurité.

Le système est isolé par une enceinte en plexiglas pour éviter les phénomènes électriques parasites, ainsi que toute perturbation de courant d'air. L'aiguille de filage est fixée sur un support réalisé par impression 3D au sein du département GMP de l'IUT de Saint-Denis et qui permet le déplacement de l'aiguille dans un plan perpendiculaire à l'axe de filage permettant d'augmenter ou de réduire la distance de l'aiguille au collecteur. La Figure 17 représente la photo du prototype de filage final réalisé au LBPS.

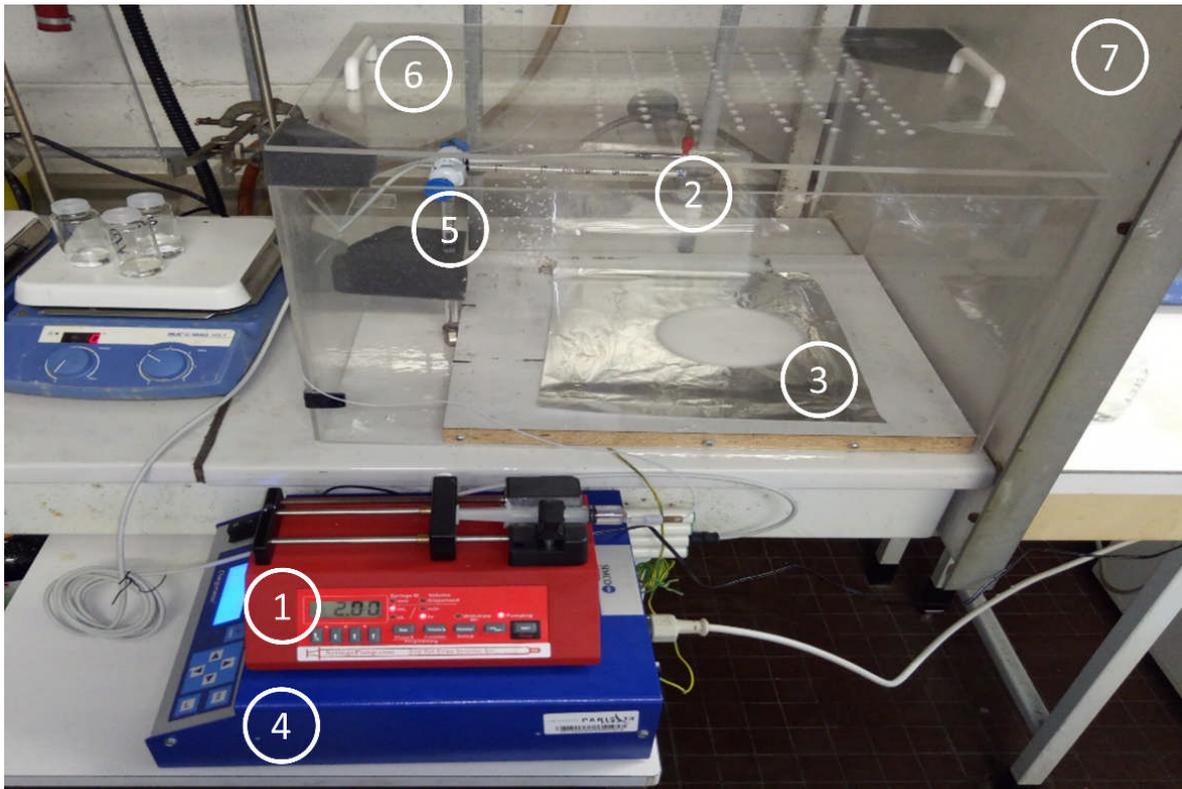


Figure 17 : Dispositif d'électrofilage développé au LBPS.

Le dispositif se compose d'un pousse seringue automatique (1) qui délivre la solution de polymère à la pointe de l'aiguille (2) située à la verticale du collecteur (3). Entre l'aiguille et le collecteur, un champ électrique à haute tension est assuré par un système générateur de très haute tension (0-60 kVs) externe à la cabine (4). Un support ajustable (5) permet de déplacer verticalement l'aiguille par rapport au collecteur fixe pour plus de polyvalence du filage. Le système est isolé par une enceinte en plexiglas (6) afin d'éviter tout risque lié au courant électrique, et cette enceinte est placée sous une hotte sorbonne qui sert comme système d'aspiration (7) pour extraire les vapeurs de solvant inhérentes au filage.

La production des membranes en fibres de PCL électrofilées sera détaillée dans les prochains chapitres de cette étude.

2.2 Greffage de polymères bioactifs :

2.2.1 Recristallisation du Styrene Sulfonate de Sodium (NaSS):

Le monomère utilisé pour apporter les groupements ioniques adéquats à la surface de la PCL est le styrène sulfonate de sodium (NaSS, *4-vinylbenzenesulfonic acid sodium salt*, Aldrich), monomère vinylique dont la formule chimique est représentée dans la Fig. 18.

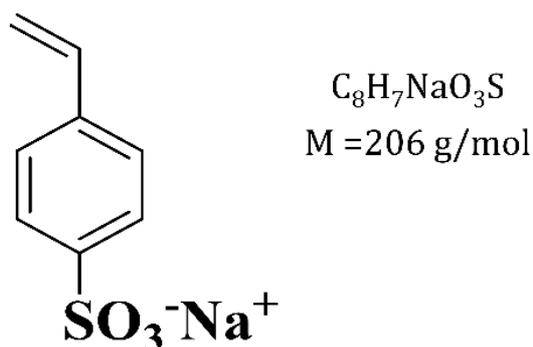


Figure 18 : Molécule du Styrene Sulfonate de Sodium (NaSS).

On purifie le styrène sulfonate de sodium par recristallisation (Fig. 19). Cette méthode consiste à dissoudre 90g (0.437 moles) de NaSS dans un mélange éthanol/eau (90/10 : 1600 mL/180 mL) à la température de 70°C pendant une nuit. Lorsque le NaSS est dissout, la solution est filtrée à chaud, sous vide (à l'aide d'un verre fritté de porosité 3). Le filtrat est placé à 4°C pendant 24h. Les cristaux blancs sont ensuite récupérés en filtrant de nouveau la solution (fritté 3). Les cristaux sont séchés à 50°C dans une étuve pendant une nuit et nous obtenons un rendement moyen de recristallisation de 60%.

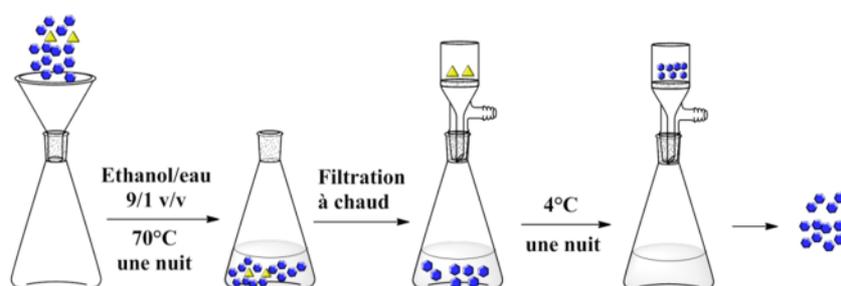


Figure 19 : Recristallisation du Styrene Sulfonate de Sodium (NaSS).

2.2.2 Greffage avec activation de la surface :

2.2.2.1 Génération des fonctions (hydro)peroxydes à la surface du PCL :

L'étape d'activation de la surface par ozonation permet de générer des radicaux à partir de peroxydes et d'hydroperoxydes issus de l'oxydation (par ozonation). La densité d'espèces actives dépend des paramètres de l'étape d'ozonation : temps, concentration en ozone.

L'ozone est généré par un ozoneur (OZONAIR BMT 802 N (ACW)) (Fig. 20) à partir d'un courant d'oxygène soumis à une haute tension. La concentration d'ozone en sortie de l'ozoneur peut être modifiée par les paramètres suivants : débit d'oxygène (d), tension (v) et temps d'ozonation (t).

Les échantillons sont placés dans le réacteur d'ozonation contenant 100 mL d'eau distillée. La solution est maintenue sous agitation le temps de l'ozonation à 30°C grâce à un bain thermostaté. Le débit d'oxygène est de 0.6 L/min, la tension appliquée au générateur d'ozone est de 100V et la pression est de 0.5 bar. Différentes durées d'ozonation (10, 20 minutes) ont été testées dans cette étude.

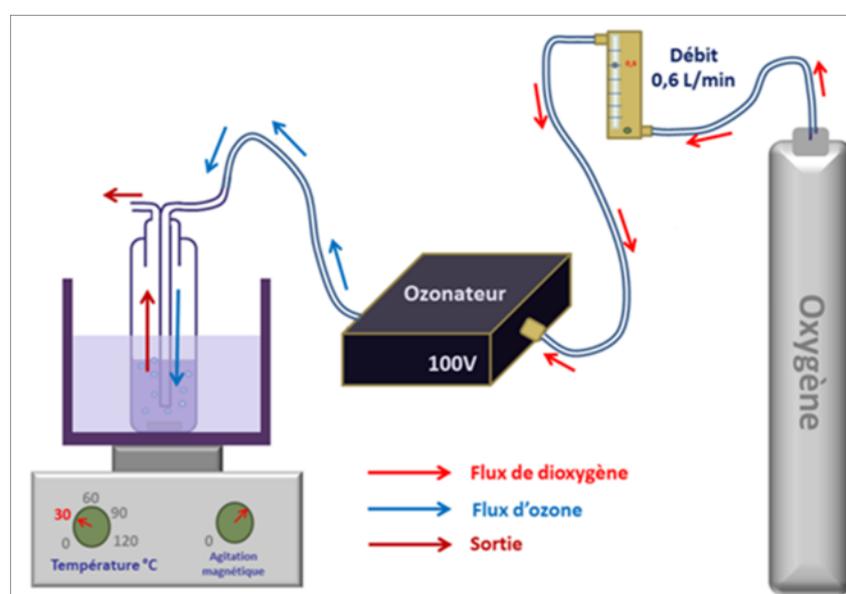


Figure 20 : Représentation schématique de l'appareil d'ozonation utilisé pour l'activation de la surface PCL.

2.2.2.2 Polymérisation du NaSS à la surface des échantillons PCL :

Suite à l'étape d'ozonation (activation des surfaces), les échantillons sont transférés dans un ballon contenant une solution aqueuse de NaSS (SIGMA 90/10) préalablement dégazagée sous argon. Le greffage se déroule comme suit :

2.2.2.2.1 Greffage thermique :

Le ballon contenant la solution de NaSS et les échantillons activés, est placé dans un bain d'huile maintenu à 45 °C pour permettre la polymérisation du NaSS sur des temps de polymérisation allant de 1 h à 3 h.

2.2.2.2.2 Greffage sous irradiation UV :

Le ballon contenant la solution de NaSS et les échantillons activés, est placé devant la lampe UV avec une puissance fixée à différents temps.

Nous avons utilisé une Lampe Lotoriel de Lot Quantum Design qui génère une puissance de 200 W à 500 W avec une puissance d'émission allant jusqu'à 220 mW/cm² (source lumineuse à arc). Les expériences ont été effectuées à 365 nm à température ambiante.

2.2.3 Greffage UV direct sans activation de la surface :

Les échantillons PCL ont été directement immergés dans un ballon contenant une solution aqueuse dégazée de NaSS, sans étape préalable d'activation. Le ballon est placé devant la lampe UV et est irradié sous UV (365 nm avec la lampe UV Lotoriel) à température ambiante, sous agitation.

A la fin de la polymérisation, les échantillons sont lavés pendant 48h sous agitation dans de l'eau distillée, avec changement des milieux toutes les 4 h. Enfin, les échantillons sont séchés à l'étuve à 37°C avant d'être caractérisés.

2.2.4 Physisorption de NaSS et polyNaSS à la surface de films PCL :

L'essai de physisorption a été réalisé, lors de la mise au point du greffage de polymères bioactifs sous irradiations UV à la surface de films PCL, afin de confirmer que la technique

de greffage utilisée dans cette étude permet bel et bien un greffage covalent du polymère et non juste une physisorption non spécifique de monomère ou de polymère sur ces échantillons. Les films PCL ont été immergés dans des solutions de NaSS à 0.7 M et de polyNaSS à 0.7 M et ont été laissés à différents temps (15, 30, 45, 60, 180 min et 24 h). Les échantillons ont ensuite été rincés pendant 48 h avec du dH₂O à température ambiante. Pour étudier la durabilité de la physisorption, le rinçage des échantillons laissés en solution pendant 24 h s'est poursuivi jusqu'à 1 mois avec un changement de dH₂O chaque semaine.

La quantité de NaSS et de polyNaSS physisorbés en fonction du temps d'incubation dans les solutions et du temps de rinçage a ensuite été déterminée.

2.3 Caractérisation de surface :

La présence de groupements sulfonates sur les surfaces PCL greffées a été démontrée à l'aide de différentes techniques de caractérisation de surface telles que la méthode colorimétrique au bleu de toluidine (BT), la mesure d'angle de contact, la spectroscopie infrarouges à transformation de Fourier à réflexion totale atténuée (ATR-FTIR), la microscopie électronique à balayage couplée à une analyse élémentaire de surface avec spectroscopie dispersive à énergie Oxford (MEB-EDX) et la spectroscopie photoélectrique par rayons X (XPS). Trois échantillons ont été utilisés pour chaque analyse.

2.3.1 Dosage de la densité de greffage au Bleu de Toluidine (BT):

Le dosage au bleu de toluidine (BT) (Fig. 21) est une technique colorimétrique dont la molécule chromophore est le BT qui absorbe dans le visible à 633nm. Cette molécule a la particularité de se complexer, *via* son groupement N⁺(CH₃)₂, avec les groupements anioniques (-SO₃⁻, -COO⁻). Nous nous sommes appuyés sur l'hypothèse avancée par l'équipe Ikada *et al.* selon laquelle une mole de BT se complexe avec une mole de groupement carboxylate [259-260].

Le dosage du bleu de toluidine donne donc la quantité de monomère greffé. Cette propriété a été transposée au NaSS, qui peut se complexer au groupe N⁺(CH₃)₂ *via* son groupement sulfonate SO₃⁻. Les échantillons greffés sont mis au contact d'une solution de BT à 5.10⁻⁴ mol/L (ajustée à pH 10 grâce à de la soude) à la température de 30°C pendant

6 heures sous agitation et à l'abri de la lumière. Cette étape correspond à la complexation du BT aux unités monomères du polymère greffé. Les échantillons sont ensuite rincés abondamment avec une solution d'hydroxyde de sodium à 1.10^{-3} mol/L pour éliminer le BT non complexé. On arrête les rinçages lorsque la solution est incolore. Le BT complexé est ensuite décomplexé au moyen d'une solution d'acide acétique à 50% (v/v) qui est laissée au contact des échantillons pendant 24 heures sous agitation.

La solution obtenue est dosée par spectrophotométrie à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin Elmer Lambda 25. Des échantillons PCL non greffés ont été utilisés comme témoins pour déterminer s'il y a réaction avec la solution de BT.

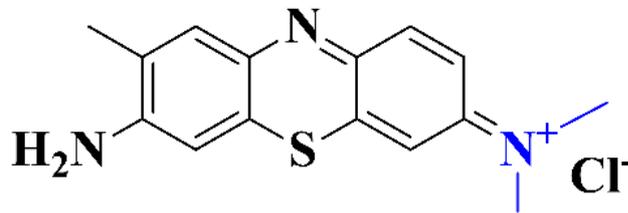


Figure 21 : Molécule de Bleu de Toluidine.

2.3.2 Mesure de l'angle de contact :

La mesure d'angle de contact nous renseigne sur l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité. La méthode consiste à mesurer l'angle de la tangente du profil d'une goutte déposée sur le substrat, avec la surface du substrat après obtention de la position d'équilibre. La mesure de l'angle de contact permet d'accéder à l'énergie libre d'une surface.

L'angle de contact (θ) entre la goutte et la surface solide résulte de l'équilibre des tensions des trois interfaces ; solide-liquide (γ_{SL}), liquide-vapeur (γ_{LV}) et solide-vapeur (γ_{SV}) (la vapeur étant ici l'atmosphère).

On peut ainsi déduire le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface. Pour cela, à l'aide de l'appareil DSA 10 (Kruss), on dépose une goutte d'eau sur la surface du matériau (le volume de la goutte d'eau posée est de $2\mu\text{L}$), et on mesure à l'aide du logiciel l'angle de contact en sélectionnant les points triples (interfaces air/liquide/solide). Cette mesure s'exprime en degré.

2.3.3 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier à Réflexion Totale Atténuée (ATR/FTIR) :

La spectrométrie Infrarouge à transformée de Fourier est une technique d'analyse moléculaire permettant d'obtenir des informations sur les liaisons chimiques et sur la structure moléculaire des matériaux analysés.

Le spectromètre utilisé qui est équipé d'un module de réflexion totale atténuée (ATR) est un Perkin Elmer FT-IR Spectrum Two. Les échantillons, greffés ou non, sont appliqués uniformément avec une force calibrée contre le cristal, afin d'assurer un contact maximal entre l'échantillon et le diamant. Un cristal de diamant ($4000-500\text{ cm}^{-1}$) avec une résolution de 4 cm^{-1} a été utilisé. Pour chaque surface, 128 scans ont été acquis.

2.3.4 Microscopie électronique à balayage couplée à une analyse élémentaire (MEB-EDX) :

La Microscopie Electronique à Balayage (MEB), produit des images de la surface des échantillons avec une résolution pouvant atteindre quelques nanomètres, et il permet également une microanalyse chimique élémentaire de la surface par la méthode EDX (Energy Dispersive X-Ray).

Le MEB utilisé pour cette étude est un Hitachi TM3000, fonctionnant entre 5 kV et 15 kV. Les échantillons ont été analysés sans préparation préalable.

2.3.5 Spectroscopie photoélectrique par rayons X (XPS) :

Les analyses XPS ont été réalisées à l'Université Pierre-et-Marie-Curie « UPMC » au laboratoire de réactivité de surface « LRS » par le Dr Vincent Humblot

Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre Omicron Argus (Taunusstein, Allemagne) équipé d'une source de rayonnement monochromatique $\text{AlK}\alpha$ ($h\nu = 1486.6\text{ eV}$) fonctionnant à une puissance de faisceau électronique de 300 W. L'émission de photoélectrons a été analysée à un angle de décollage de 90° ; les analyses ont été effectuées sous ultravide ($\leq 10^{-10}\text{ Torr}$) après introduction par sas dans la chambre principale. Les spectres ont été obtenus en établissant une énergie de passage de 100 eV pour le spectre de mesure, et une énergie de passage de 20 eV a été choisie pour les

régions à haute résolution. Les énergies de liaison ont été étalonnées par rapport à l'énergie de liaison C1s des atomes de carbone aliphatiques à 284.8 eV. Les intensités des pics des éléments ont été corrigées par des facteurs Scofield [290]. Le logiciel Casa XPS v.2.3.3.15 (Casa Software Ltd, UK) a été utilisé pour ajuster les spectres et une ration gaussienne/lorentzienne a été appliquée (G/L ration = 70/30).

Pour cette partie XPS, l'ensemble des échantillons analysés étaient des membranes en fibres PCL électrofilées.

2.4 Etude des propriétés intrinsèques du polymère PCL :

Les changements possibles des propriétés intrinsèques du PCL, après les différents traitements subis au cours des processus de fonctionnalisation ou dégradation, ont été étudiés par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et chromatographie d'exclusion stérique (SEC).

2.4.1 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC) :

La calorimétrie différentielle à balayage (en anglais Differential Scanning Calorimetry ou DSC) est une technique d'analyse thermique. Elle mesure les différences des échanges de chaleur entre un échantillon à analyser et une référence. Elle permet de déterminer les transitions de phase : la température de transition vitreuse (T_g) des polymères, des verres métalliques et des liquides ioniques ; les températures de fusion et de cristallisation ; les enthalpies de réaction, pour connaître les taux de réticulation de certains polymères. Les analyses sont réalisées sous balayage d'un gaz inerte (par exemple, l'azote ou l'argon) pour éviter toute réaction du matériau à étudier avec l'atmosphère du four.

Cette technique repose sur le fait que lors d'une transformation physique, telle qu'une transition de phase, une certaine quantité de chaleur est échangée avec l'échantillon pour être maintenu à la même température que la référence. Le sens de cet échange de chaleur entre l'échantillon et l'équipement dépend de la nature endothermique ou exothermique du processus de transition. Ainsi, par exemple, un solide qui fond va absorber plus de chaleur pour pouvoir augmenter sa température au même rythme que la référence. La fusion (passage de l'état solide à l'état liquide) est en effet une transition de phase endothermique car elle absorbe la chaleur. De même,

l'échantillon peut subir des processus exothermiques, tels que la cristallisation, lorsqu'il transmet de la chaleur au système.

L'analyse des propriétés thermiques du PCL a été réalisée à l'aide d'un calorimètre DSC 8000 (PerkinElmer, Waltham, USA). Les mesures ont été effectuées sous atmosphère d'azote. Les échantillons de PCL ont été scannés une fois de - 80 °C à 100 °C à une température/vitesse de 10 °C/min. L'enthalpie (ΔH_m) et la température de fusion (T_m) ont été calculées à partir du premier et unique passage à l'aide d'une plate-forme logicielle Pyris™ : la température de fusion a été prise au maximum du pic et l'enthalpie de fusion a été calculée comme l'aire de surface du pic de fusion. Le degré de cristallinité (X_c) a été calculé en utilisant l'équation 1 :

$$(1) X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \times 100$$

Où ΔH_m^0 représente l'enthalpie de fusion du PCL 100 % cristallin ($\Delta H_m^0 = 135 \text{ J.g}^{-1}$) [291]. Pour chaque condition, trois échantillons ont été analysés.

2.4.2 Chromatographie d'exclusion stérique (SEC) :

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC pour size exclusion chromatography en anglais) est une méthode de chromatographie en phase liquide permettant de séparer des macromolécules en fonction de leur volume hydrodynamique. Elle est notamment utilisée pour faire l'étude de polymères.

Les analyses en SEC ont été réalisées sur un instrument Shimadzu Prominence équipé d'un échantillonneur automatique SIL-20AHT et d'un détecteur à indice de réfraction différentiel RID-10A Shimadzu. Le système a été équipé d'une pré-colonne de gel Ultrahydrogel™ (Waters) (6 × 40 mm) et de deux colonnes analytiques Ultrahydrogel™ (Waters) (7.8 × 300 mm). Le tétrahydrofurane (THF, Carl Roth) a été utilisé comme phase mobile. Les échantillons ont été dissous dans du tétrahydrofurane.

Avant l'injection, les échantillons ont été filtrés à travers des membranes d'acétate de cellulose (taille des pores 0.45 µm). Les poids moléculaires des polymères (M_n) et la dispersité (\mathcal{D}) ont été déterminés à l'aide du logiciel LcSolution GPC par un étalonnage classique obtenu à partir d'étalons PMMA (Agilent) allant de ~500 à ~1.5 × 10⁶ g.mol⁻¹.

2.5 Etude des propriétés mécaniques des échafaudages :

Une des conditions préalables à l'utilisation des échafaudages en fibres électrofilées dans des applications biomédicales est leurs propriétés mécaniques adéquates. En effet, il a été démontré que la résistance et la déformabilité des fibres influencent notablement la migration, la prolifération et la différenciation ainsi que la morphologie des cellules *in vitro* [292-294]. L'intégrité structurale et la résistance mécanique de l'échafaudage sont donc très importantes dans la formation du nouveau tissu [295]. À cet égard, les propriétés mécaniques des échafaudages fibreux et des fibres constitutives sont pertinentes dans la perspective d'une application en régénération tissulaire.

Les propriétés élastiques (ou viscoélastiques) des échafaudages en fibres électrofilées sont le plus souvent abordés par le biais des essais macroscopiques de traction et ce pour des raisons de commodités. Quant aux essais mécaniques sur des fibres individuelles d'un diamètre $< 1 \mu\text{m}$, ils ne sont pas réalisables par mesure conventionnelle. Cela nécessite des technologies alternatives capables de manipuler des fibres individuelles, mesurer des déformations de l'ordre du nanomètre et des forces avec une précision de l'ordre du nN. Les techniques contournant les difficultés susmentionnées sont, d'une part, les systèmes d'essais micro et nano tension et, d'autre part, des techniques basées sur des mesures au microscope à force atomique (AFM).

Les tests mécaniques sont en général des sollicitations en traction uni- ou bi-axiale, mais aussi de la nano-indentation, de la mesure de fréquence de résonance ou de la traction microscopique sur des membranes en fibres électrofilées de structures différentes ou dans des milieux bien définis selon les applications. Ces fibres électrofilées peuvent, si elles sont orientées dans une direction privilégiée avoir des caractéristiques mécaniques non isotropes notamment lorsque les fibres sont collectées sur des cylindres en rotation. Ces tests ont pour vocation à déterminer les propriétés de résistance mécanique de ces structures, liées bien souvent à l'application visée que ce soit pour de l'ingénierie tissulaire ou pour d'autres applications industrielles.

2.5.1 Rappels de mécanique :

2.5.1.1 La déformation nominale :

La déformation nominale ε , exprimée en pourcentage dans cette étude, est définie le logarithme népérien de la longueur utile instantané (l_t) de l'échantillon divisé par sa longueur utile initiale de référence suivant la relation (1):

$$\varepsilon = \frac{l_t}{l_0}$$

2.5.1.2 La contrainte nominale (ou conventionnelle) :

La contrainte nominale S , appelée aussi contrainte Lagrangienne, est la force instantanée (F_t) divisée par la surface de la section nominale ou de référence (A_0) de l'échantillon tel qu'indiqué dans la relation (2):

$$S = \frac{F_t}{A_0}$$

2.5.1.3 Propriétés mécaniques :

Nous avons déterminé les propriétés classiques des matériaux, à savoir ; le module d'élasticité (E), la contrainte (S_{\max}) et la déformation (ε_{\max}) maximale.

2.5.1.4 La relaxation de contrainte :

La relaxation de contrainte qui est une propriété non instantanée est une méthode expérimentale d'analyse de la viscoélasticité linéaire. Elle consiste, après un chargement monotone de traction, compression ou cisaillement, à imposer à l'échantillon une déformation constante pendant une certaine durée. On mesure ensuite la variation de la force en fonction du temps. Cette variation est due à des organisations internes faisant intervenir les notions de résistance à l'écoulement, de viscosité, d'amortissement et visant à minimiser l'énergie interne. C'est le phénomène de relaxation.

2.5.1.5 Calcul des temps caractéristiques de relaxation :

Dans le cadre de la viscoélasticité linéaire, le développement de la contrainte de relaxation en somme d'exponentielles appelé série de Prony, permet l'identification expérimentale des temps caractéristiques de relaxation (τ_1, τ_2) et des rapports entre modules élastiques (γ_1, γ_2) :

$$S(t) = S_{max} \left(1 + \gamma_1 \left(e^{-\frac{t}{\tau_1}} - 1 \right) + \gamma_2 \left(e^{-\frac{t}{\tau_2}} - 1 \right) \right)$$

Nous obtenons donc une courbe normée par la contrainte nominale relaxée. Dans notre étude, nous avons décidé de nous limiter à 2 temps caractéristiques de relaxation (τ_1, τ_2) .

2.5.2 Dispositif et caractérisation :

L'électrofilage de la solution de PCL pendant 2 heures nous a permis d'obtenir des échafaudages de fibres PCL électrofilées qui, pour des essais de traction, ont été découpés en éprouvettes normalisées grâce à des emporte-pièces (Fig. 22). Nous avons à notre disposition deux emporte-pièces de type H2 et H3. Les dimensions des éprouvettes résultantes sont représentées à la Figure 22. La faible course du vérin, limitée à 10 cm combinée à une grande déformation des membranes PCL, nous a contraints à travailler prioritairement avec les emporte-pièces de type H3.

L'épaisseur des échantillons testés a été mesurée par le biais d'une micrographie de la section utile des éprouvettes réalisée au MEB, à partir desquelles nous avons par la suite calculé l'aire de la section à l'aide du logiciel « ImageJ ». La porosité des échafaudages fibreux n'a donc pas été prise en compte lors des mesures du module élastique sous sollicitations de traction uni-axiale.

Un banc d'essais de traction uni-axiale a été conçu et mis en œuvre au sein de l'équipe LBPS du laboratoire CSPBAT. Ce dispositif expérimental est composé d'un vérin électrique d'une capacité de charge de 600 daN avec son contrôleur, des capteurs de forces de capacités variables (10 daN, 50 daN, 100 daN, 500 daN), un capteur de déplacement (course de 50 mm) pour des essais alternés et un système d'acquisition des données.

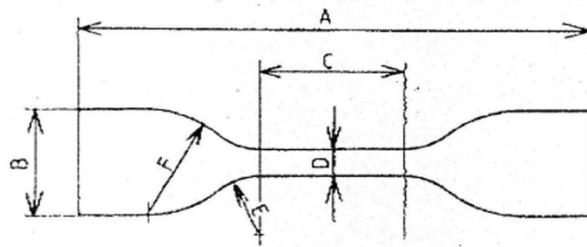


Figure 1 — Emporte-pièces pour éprouvettes haltères
Forme du tranchant

Tableau 1 — Emporte-pièces pour éprouvettes haltères
Dimensions du tranchant

Dimensions en millimètres

Type d'éprouvette	A Longueur totale	B Largeur des têtes	C Longueur de la partie étroite	D (1) Largeur de la partie étroite	E Petit rayon	F Grand rayon
Type H1	115	25 ± 1,0	33 ± 2,0	6 ^{+0,4} ₀	14 ± 1,0	25 ± 2,0
Type H2	75	12,5 ± 1,0	25 ± 1,0	4 ± 0,1	8 ± 0,5	12,5 ± 1,0
Type H3	50	8,5 ± 1,0	17 ± 0,5	4 ± 0,1	7,5 ± 0,3	10 ± 0,3
Type H4	35	6 ± 0,5	12 ± 0,5	2 ± 0,1	3 ± 0,1	3 ± 0,1

(1) Les variations sur un seul et même emporte-pièces ne doivent pas dépasser 0,05 mm.

Figure 22 : Forme et dimensions des emporte pièces pour découper des éprouvettes haltères.

Toutes les éprouvettes ont été montées entre des pinces auto-serrantes. Les essais de traction ont été effectués, en testant trois différentes vitesses ; 0,1, 0,5 et 1 mm.s⁻¹ à température ambiante. Le module d'Young (en MPa) et déformation à la rupture (%) ont été calculés à partir des données enregistrées et traitées. Pour obtenir le module de Young, nous avons calculé la pente de chaque courbe contrainte-déformation dans sa région de déformation élastique. Les photographies de la Figure 24 illustrent le montage expérimental : (1) Vérin électrique (100 mm de course), (2) unité de contrôle, (3) capteur de force (10 daN), (4) capteur de déplacement (course de 50 mm) et (5) pinces auto-serrantes adaptées aux polymères.



Figure 23 : Montage expérimental des tests de tractions sur éprouvettes normalisées.

2.6 Etude de la réponse biologique :

L'étude de la réponse biologique des différents scaffolds en PCL électrofilée greffés de polyNaSS par la technique du « grafting from » permet de mettre en évidence un effet du greffage du polymère bioactifs sur la réponse cellulaire. Cette partie de l'étude a été réalisée en collaboration avec le Dr Emile Jubeli et le Pr Najet Yagoubi, au laboratoire de Matériaux et Santé EA 401, UFR de pharmacie, Université Paris-sud, 92290 Châtenay-Malabry.

2.6.1 Préparation des échafaudages pour les tests biologiques :

Conditionnement des échantillons :

Préalablement aux tests biologiques, les différents échafaudages greffés ou non greffés sont conditionnés par des lavages abondants afin de stabiliser le pH de la surface au pH physiologique (7.33). Les lavages durent chacun trois heures et sont répétés trois fois, en suivant un protocole établi au laboratoire, comme suit :

- NaCl 1.5 mol.L⁻¹
- NaCl 0.15 mol.L⁻¹
- Eau ultrapure pour enlever l'excès de NaCl et éviter la formation de cristaux
- Tampon Phosphate Buffered Saline (PBS) pH physiologique

Les échantillons sont ensuite séchés à l'étuve à 37 °C, avant d'être ensuite stérilisés par exposition de 15 min aux rayonnements Ultra-violet, sur chaque face. Avant chaque expérience, les échafaudages (disques de 16 mm de diamètre) sont déposés au fond de puits individuels d'une plaque de culture TCPS 24 puits, maintenus au fond grâce à des inserts en polypropylène (PP), et sont incubés dans du milieu complet ; Dulbecco's Modify Eagle Medium (DMEM) additionné de 10 % de sérum de veau foetal (FBS), 1% (v/v) d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine), 1 % de L-glutamine pendant toute la nuit pour équilibrer les surfaces et permettre aux protéines de s'adsorber.

2.6.2 Lignée cellulaire :

Les cellules utilisées pour cette étude sont issues d'une lignée de fibroblastes de souris, la lignée L929. C'est une lignée sous-clone de la souche parentale L, établie par W R Earle

en 1940. L'une des premières à s'être établie en culture continue. La souche L a été dérivée du tissu sous-cutané aréolaire et adipeux d'une souris C3H/An mâle de 100 jours. Les cellules L929 sont cultivées dans du milieu complet.

2.6.3 Ensemencement des cellules :

Les cellules L929 de fibroblastes ont été ensemencées sur les échafaudages en fibres PCL stérilisés, maintenues au fond de puits, à une densité de 5×10^4 cellules/puits, et maintenues en place pour adhérer et s'étaler sur les échafaudages.

2.6.4 Viabilité cellulaire :

Les essais permettant la mesure quantitative de la viabilité cellulaire pendant la culture cellulaire sont essentiels pour toute expérience impliquant des biomatériaux ou des dispositifs médicaux. Dans cette étude, qui traite de la modification post-électrofilage d'échafaudages électrofilés par l'immobilisation covalente d'un polymère bioactif à la surface des fibres, il était impératif de tester la viabilité cellulaire avec une des lignées cellulaires de mammifères afin d'évaluer d'éventuels effets cytotoxiques que le composé pourrait exercer sur les cellules de l'organisme.

La viabilité cellulaire a été évaluée à l'aide d'un test MTT. Nous avons utilisé un test de toxicité standard, qui est le test de viabilité le plus couramment utilisé dans le monde, pour évaluer la viabilité cellulaire sur les différents échafaudages qu'ils soient greffés ou non greffés. Dans ce test, nous avons maintenu une lignée cellulaire de fibroblastes de souris L929 dans le DMEM (Sigma Aldrich) contenant 10 % de FBS, L-glutamine, pénicilline et streptomycine à 37 °C dans un air humidifié contenant 5% de CO₂.

Ce test colorimétrique utilise la réduction d'un sel de tétrazolium jaune (3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5 bromure de diphényltétrazolium ou MTT) (MTT, Sigma) pour mesurer l'activité métabolique cellulaire comme indicateur de la viabilité cellulaire. Les cellules viables contiennent des enzymes oxydoréductases NAD(P)H-dépendantes qui réduisent le réactif MTT en formazan, un produit cristallin insoluble de couleur pourpre foncée. Les cristaux de formazan sont ensuite dissous en utilisant une solution de solubilisation et l'absorbance est mesurée à 500-600 nanomètres en utilisant un lecteur

de plaques. Plus la solution est sombre, plus le nombre de cellules viables et métaboliquement actives est élevé.

Description du protocole que nous avons utilisé:

- ✓ Passer les cellules sur les échafaudages à une densité de 5×10^4 cellules/puits.
- ✓ Incuber 48 h à 37 °C et 5 % CO₂.
- ✓ A la fin de l'incubation, ajouter 100 µL/puits d'une solution MTT/PBS, fraîchement préparée, à une concentration finale de 0.5 mg.mL⁻¹ (sans éliminer le milieu).
- ✓ Incuber pendant 2 h à 37 °C, jusqu'à ce que les cristaux de formazan pourpres intracellulaires soient visibles au microscope.
- ✓ A la fin de l'incubation, éliminer le milieu de culture et dissoudre les cristaux violets formés, en ajoutant 500 µL de Diméthylsulfoxyde (DMSO) dans chaque puits.
- ✓ Agiter la plaque pendant 30 minutes, à l'abri de la lumière, à température ambiante, jusqu'à ce que les cellules soient lysées et que les cristaux violets se soient dissous.
- ✓ Transférer 100 µL de chaque puit dans un puit d'une plaque 96 puits.
- ✓ Mesurer l'absorbance à 570 nm avec un lecteur de plaque (ELx800 - BioTek).

La lecture de l'absorbance du blanc (puits vides) doit être soustraite de tous les échantillons. Les absorbance des échantillons testés doivent ensuite être divisées par celles du contrôle et multipliées par 100 pour donner un pourcentage de viabilité ou de prolifération cellulaire (voir la formule ci-dessous). Les valeurs d'absorbance supérieures au contrôle indiquent une prolifération cellulaire, tandis que des valeurs plus faibles suggèrent la mort cellulaire ou l'inhibition de la prolifération. L'absorbance du contrôle étant celle des cellules non traitées.

$$\% \text{ de cellule viables} = \frac{(\text{abs}_{\text{échantillon}} - \text{abs}_{\text{blanc}})}{(\text{abs}_{\text{contrôle}} - \text{abs}_{\text{blanc}})} \times 100$$

A noter que la sensibilité d'un test MTT est inférieure à celle des tests fluorescents ou luminescents, en particulier avec des cellules qui ne prolifèrent pas facilement ou des cellules à faible activité métabolique. De plus, certains composés chimiques interfèrent avec la réduction du MTT en formazan et ne sont donc pas facilement compatibles avec les tests MTT. Ceux-ci comprennent les polyphénols, la vitamine A, la coenzyme A et le DTT (dithiothréitol). Il convient également de noter que l'exposition au MTT et la

formation de cristaux de formazan sont cytotoxiques et entraînent des modifications dommageables de la morphologie cellulaire.

2.6.5 Morphologie cellulaire :

Afin d'observer l'étalement des cellules et leur façon d'adhérer aux différents scaffolds, nous avons étudié la morphologie cellulaire à différents temps, sous MEB (en platine Peltier) et en microscopie à fluorescence.

Pour cela, nous avonsensemencé les échafaudages avec des fibroblastes de souris L929 dans le DMEM (Sigma Aldrich) contenant 10 % de FBS, L-glutamine, pénicilline et streptomycine à 37 °C dans un air humidifié contenant 5% de CO₂, à différents temps de culture.

2.6.5.1 Fixation des cellules sans déshydratation pour observation en MEB :

A la fin de chaque durée d'incubation souhaitée ; dans cette étude nous avons testés 2, 4, 7 jours comme temps d'incubation, le milieu est enlevé. Les surfaces sont ensuite rincées deux fois au tampon PBS, puis la fixation des cellules adhérees est réalisée par addition de 500 µL de formaldéhyde/PBS à 4 % (v/v) pendant 30 minutes à 4 °C.

Les surfaces sont ensuite rincées deux fois au tampon PBS, puis 5 min avec de l'eau ultra pure afin d'éviter la formation de cristaux. Les plaques contenant les échafaudages avec les cellules fixées sont ensuite conservées à 4 °C pendant toute la nuit, avant d'être observés au MEB en utilisant la platine Peltier (échantillons humides).

2.6.5.2 Marquage des cellules pour observation en microscopie à fluorescence :

Afin d'avoir une analyse plus poussée et plus détaillée de la morphologie cellulaire, nous avons réalisé un marquage des noyaux et du cytosquelette cellulaires. Le noyau a été marqué au DAPI ou 4',6-diamidino-2-phénylindole, qui est une molécule fluorescente capable de se lier fortement aux bases adénine (A) et thymine (T) de l'ADN, et la phalloïdine a été utilisé pour marquer les fibres d'actine du cytosquelette (réseau constituant l'architecture cellulaire) pour permettre une analyse précise des cellules adhérees et étalées sur les échafaudages. Le marquage est réalisé après 3 jours d'ensemencement des cellules sur les échafaudages.

Pour le marquage, nous avons procédé comme suit :

A la fin de l'incubation, le milieu est éliminé et les surfaces sont rincées deux fois au tampon PBS, puis la fixation des cellules adhérentes est réalisée par addition de 500 μL de formaldéhyde/PBS à 4 % (v/v) pendant 30 minutes à 4 °C. Après deux nouveaux rinçages avec une solution d'albumine bovine (BSA) à 0.4 g.L^{-1} dans du PBS, les membranes cellulaires sont perméabilisées par l'action du Triton X100 à 0.1 % (v/v) dans du PBS pendant une minute à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées avec une solution BSA/PBS à 2 % (p/v) pendant 30 minutes, puis incubées dans une solution Atto phalloïdine (Sigma-Aldrich) diluée 1 :100 dans 1 % BSA/PBS (p/v) pendant 1 h à température ambiante en protégeant de la lumière. Les surfaces sont ensuite rincées deux fois avec de l'eau ultra pure (5 min pour chaque rinçage). Enfin, les surfaces sont préparées pour l'observation en rajoutant du milieu de montage contenant du DAPI (VECTASHIELD Antifade Mounting Medium with DAPI).

Les plaques contenant les échafaudages avec les cellules marquées sont ensuite conservées à 4 °C pendant toute la nuit, avant d'être observés à l'aide d'un Vidéo-microscope Zeiss Axiolab. Ce microscope est doté d'une caméra permettant de prendre des photographies qui sont ensuite analysées par traitement d'image.

L'expérience est menée pour chaque condition de greffage sur les différents échafaudages, à raison d'un minimum de 3 échantillons analysés par condition.

2.6.6 Prolifération cellulaire :

Des fibroblastes de souris L929 ont étéensemencés sur des échafaudages en PCL électrofilée greffées et non greffées placés dans des plaques TCPS de 24 puits dans un milieu de culture standard et incubées à 37 °C et 5 % de CO_2 avec des temps d'incubation de 2, 4 et 7 jours, avec des échantillons en triple exemplaire pour chaque condition testée. A l'aide du même test MTT utilisé pour les expériences de viabilité cellulaire, le nombre de cellules adhérentes a été mesuré dans chaque puits aux jours 2, 4 et 7.

III

Mise au point du greffage de polymères bioactifs, sous irradiation UV, sur des surfaces PCL

Dans ce chapitre, nous décrivons la mise au point du greffage direct (« grafting from ») de polymère bioactifs, par amorçage en utilisant des irradiations UV, sur des surfaces PCL. Le greffage a été réalisé en deux étapes. Les surfaces PCL ont été (1) oxydées chimiquement afin de permettre la formation d'espèces (hydro)peroxydes. (2) Puis immergées dans une solution de styrène sulfonate de sodium (NaSS) et placées sous irradiation UV pour induire la décomposition des (hydro)peroxydes en radicaux capables d'initier la polymérisation du monomère à partir de la surface. Divers paramètres, tels que le temps de polymérisation, l'effet de l'activation de surface, la puissance des irradiations UV et la concentration en monomère ont été étudiés afin d'optimiser le procédé. La quantité de polymère greffée sur les surfaces PCL a d'abord été déterminée par dosage colorimétrique, puis caractérisée par différentes techniques d'analyses de surface telles que la mesure de l'angle de contact, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier à réflexion totale atténuée (ATR-FTIR), la microscopie électronique à balayage couplée avec une analyse élémentaire (MEB-EDX). Les résultats ont montré que le greffage de polymères bioactifs a été réussi en utilisant des radicaux provenant d'(hydro)peroxydes, obtenus par amorçage UV, capables d'initier la polymérisation radicalaire du monomères à partir de surfaces PCL. Ce chapitre présente le développement d'une nouvelle approche de greffage radicalaire, par amorçage UV, qui permet de greffer avec succès, de manière covalente, le polymère bioactif polyNaSS sur des surfaces PCL.

L'ingénierie tissulaire est un domaine prometteur qui étudie la réparation et la régénération des tissus endommagés à l'aide d'interactions cellule-échafaudage. Par conséquent, les échafaudages doivent être non toxiques et posséder des caractéristiques de base telles que la biocompatibilité, la porosité et des propriétés mécaniques suffisantes. La polycaprolactone (PCL) a été approuvée pour des applications biomédicales et offre d'excellentes propriétés mécaniques et une biodégradation lente, ce qui en fait un matériau approprié pour une utilisation comme support pour l'ingénierie tissulaire.

Cependant, une des limitations bien admises du PCL pour les applications d'ingénierie tissulaire est son hydrophobicité, qui peut conduire à un manque de réponse cellulaire favorable. Une des approches les plus courantes en ingénierie tissulaire est la conjugaison ou l'immobilisation de molécules bioactives sur la surface des échafaudages afin d'améliorer l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire. Pour surmonter ce problème d'hydrophobicité du PCL, différentes approches ont été élaborées ; incluant l'introduction de groupements polaires par traitement de surface, l'adsorption de biomolécules sur la surface et l'immobilisation de composés bioactifs fixés de façon covalente à la surface du matériau.

Des études antérieures réalisées dans le laboratoire LBPS ont montré que les polymères ou copolymères portant des groupements anioniques tels que les sulfonates, carboxylates et phosphonates peuvent favoriser l'adhésion et la différenciation cellulaire [296-298]. La distribution de ces groupements ioniques le long des chaînes macromoléculaires crée des sites actifs qui peuvent interagir avec des protéines extracellulaires, comme la fibronectine, impliquée dans la réponse cellulaire.

L'équipe LBPS a démontré que les surfaces fonctionnalisées par greffage de polyNaSS modulaient la réponse cellulaire et bactérienne [261,265,267].

Récemment, le greffage du polyNaSS a été réalisé avec succès sur des divers biomatériaux, en utilisant des radicaux issus de peroxydes capables d'induire la polymérisation radicalaire du monomère NaSS. Dans le cas des surfaces en PCL (films PCL), l'ozonation des surfaces crée des espèces d'(hydro)peroxydes à la surface, qui sous l'effet du chauffage produisent des radicaux pour initier la polymérisation du monomère ionique NaSS [271-272].

Lorsqu'elle est exposée à des irradiations UV, la surface des polymères génèrent des sites réactifs qui peuvent être utilisés pour amorcer la polymérisation du greffage UV-induit [299]. Par exemple, l'irradiation UV a été utilisée pour induire une fonctionnalité acide carboxylique sur du PMMA [300], à la surface de films de PET [301], aux surfaces de polyéther éther cétone (PEEK) [302], ainsi que pour activer les surfaces de PS pour l'immobilisation enzymatique [303], et dans des applications en ingénierie tissulaire [304]. L'irradiation UV a également été utilisée pour initier la polymérisation par greffage radicalaire de composés bioactifs. Par exemple, la N-vinylpyrrolidone a été photo-greffée à la surface de films de PP pour développer un matériau antimicrobien [305].

Récemment, l'équipe du LBPS a développé le greffage du polyNaSS en utilisant des irradiations UV [259-261,266,273-275]. La modification chimique par irradiation UV est un procédé simple qui peut également être utilisé comme alternative appropriée en raison de son faible coût et de sa vitesse de réaction rapide.

Dans cette partie de l'étude, en se basant sur ce procédé de greffage mis au point au sein du laboratoire du LBPS, nous décrivons une méthode simple, rapide et directe pour greffer des groupements sulfonates sur des films PCL en utilisant des irradiations UV, avec ou sans activation de la surface. Pour démontrer l'efficacité de ce procédé, les surfaces PCL modifiées ont été caractérisées par différentes techniques.

Divers paramètres, tels que le temps de polymérisation, l'effet de l'activation de surface par ozonation, la puissance des irradiations UV et la concentration en monomère ont été étudiés afin d'optimiser le rendement du greffage de polyNaSS sur les surfaces PCL.

3.1 Greffage de polyNaSS avec activation de la surface :

La polymérisation radicalaire permet de greffer des polymères bioactifs, ici le polyNaSS, sur des surfaces PCL. Cette méthode implique l'ozonation des films PCL grâce à un générateur d'ozone qui permet de produire une couche superficielle d'(hydro)peroxydes de PCL. En effet, l'oxydation des polymères, à l'ozone, conduit à la création de radicaux peroxydes qui se transforment ensuite en diverses fonctionnalités telles que les (hydro)peroxydes [272].

L'immersion des films de PCL dans une solution aqueuse de monomère NaSS chauffée induit la décomposition des radicaux (hydro)peroxydes de PCL et initie la polymérisation

du NaSS (Fig. 24), comme il a été démontré précédemment dans des études réalisées au laboratoire [271-275].

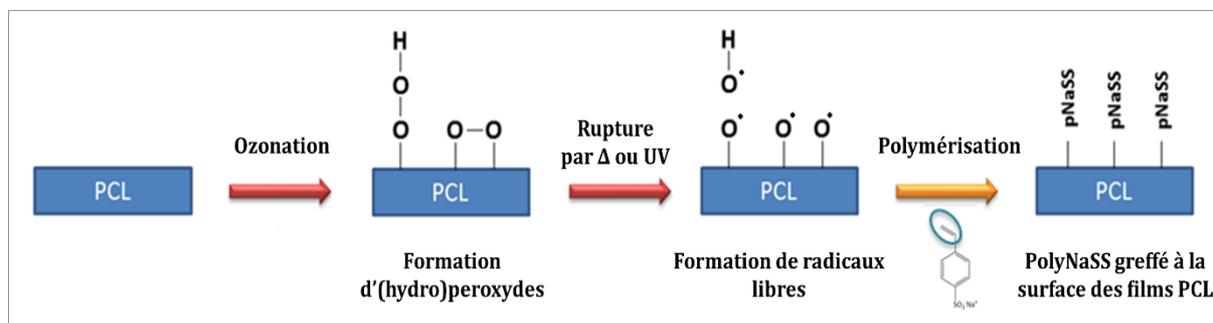


Figure 24 : Procédé de greffage du polyNaSS sur une surface PCL. La surface est ozonée avec formation d'(hydro)peroxydes et la chaleur ou l'irradiation UV donnent des radicaux par clivage homolytique qui initie la polymérisation.

3.1.1 Greffage par voie thermique :

Le greffage de polyNaSS sur les films PCL a été réalisé pendant 3 h avec une concentration de monomère de 0.7 M, en maintenant le système à 45 °C. Nous avons testé deux temps d'ozonation (20 et 10 min). L'ozonation est noté (Oz).

La quantité de polyNaSS greffée à la surface des films PCL a été déterminée par la méthode de dosage colorimétrique au BT. Nous avons constaté que la quantité de polyNaSS greffée à la surface des films a atteint sa valeur la plus élevée pour une ozonation de 20 min $(3.87 \pm 0.16) \times 10^{-5} \text{ mol.g}^{-1}$.

Une ozonation plus courte (10 min) entraîne une diminution de la quantité de polyNaSS greffé $(1.94 \pm 0.10) \times 10^{-5} \text{ mol.g}^{-1}$ (Fig. 25). Cette différence peut être expliquée par le fait que la quantité d'(hydro)peroxydes générés sur la surface des films PCL pendant l'ozonation, atteint une valeur maximale à 20 min par rapport à une ozonation de 10 min [272].

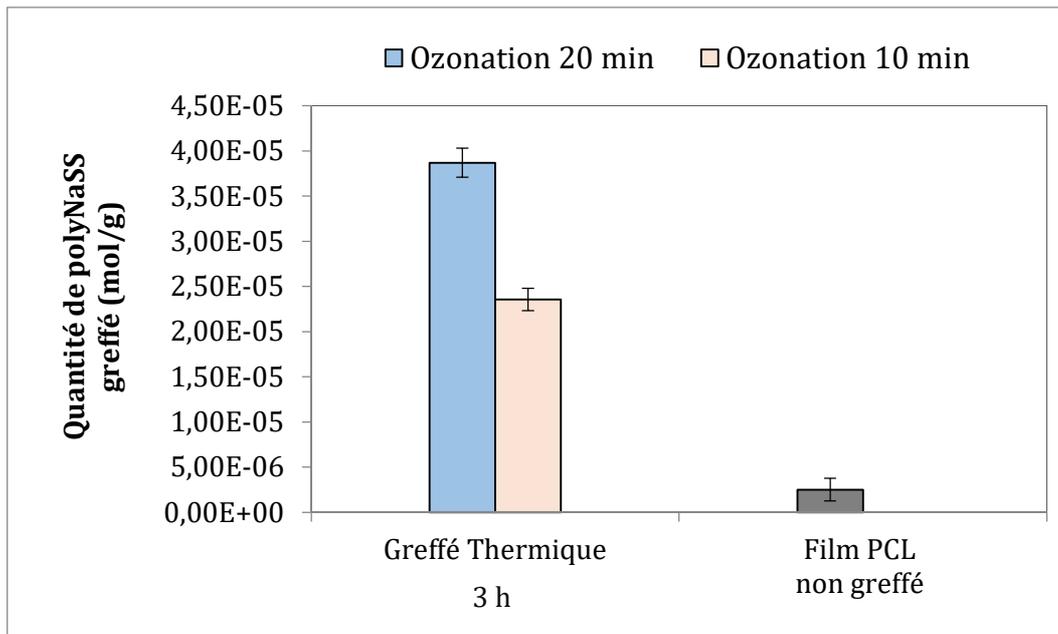


Figure 25 : Greffage thermique 3 h avec activation de la surface par 20 et 10 min d'ozonation, à 0.7 M.

Comme pour les échantillons greffés, nous avons également déterminé la quantité de groupements sulfonates à la surface des films PCL non greffés. Les films non greffés présentent un taux de $(2.52 \pm 0.14) \times 10^{-6} \text{ mol.g}^{-1}$, ce qui signifie une différence d'un log entre les échantillons greffés et non greffés.

D'autres analyses ont été effectuées pour confirmer la présence des groupements sulfonates du polyNaSS sur les surfaces des films PCL greffés thermiquement.

Nous avons évalué l'angle de contact avec l'eau : l'angle de contact (θ) est une mesure de la mouillabilité d'un solide par un liquide (dans notre cas l'eau). Dans le cas d'un mouillage complet, l'angle de contact est proche de 0° (surface super hydrophile), entre ($0^\circ - 90^\circ$), la surface est mouillante et au-dessus de 90° , la surface est hydrophobe [259-260,266,306].

Le greffage thermique de polyNaSS sur les films PCL, a donné un angle de contact de $45.4 \pm 3.3^\circ$ pour les films greffés après 20 min d'ozonation, et de $54.7 \pm 2.4^\circ$ pour ceux greffés après 10 min d'ozonation ce qui nous confirme la présence de polyNaSS, qui est connu pour être un polymère hydrophile, sur les échantillons. Le polyNaSS est un polymère anionique portant des groupements sulfonates, permettant lorsqu'il est greffé sur une surface, de diminuer l'angle de contact, donnant de ce fait des propriétés

hydrophiles aux surfaces. Les échantillons contrôle (films PCL non greffés) ont donné un angle de contact de $95.1 \pm 6.5^\circ$.

3.1.2 Greffage sous irradiations UV :

Nous avons développé et amélioré le concept en remplaçant la source pour former les radicaux (source thermique) par une source UV afin de réduire le temps de réaction. Des études antérieures réalisées dans le laboratoire LBPS ont montré que le greffage de polyNaSS a été réalisé avec succès sur des surfaces métalliques (surfaces de titane et d'alliages de titane) en utilisant des radicaux issus de (hydro)peroxydes de titane, produits par irradiation UV, capables d'initier la polymérisation radicalaire du monomère styrène sulfonate de sodium (NaSS) [259-261,266].

Cette technique de « grafting from » par amorçage UV qui est présentée dans cette partie, a été développée au laboratoire, et a déjà été présenté sous la forme d'articles scientifiques [259-261] et a fait l'objet d'un brevet français et européen [266].

Le mécanisme d'amorçage par voie UV et les paramètres étudiés pour proposer un protocole optimisé du greffage de polyNaSS sur le titane par comparaison au greffage par voie thermique a été détaillé.

Pour produire des radicaux à partir de la couche superficielle d'(hydro)peroxydes de PCL, nous nous attendions à ce que la surface PCL pré-ozonée ait besoin de la même puissance d'irradiation UV que dans le cas du greffage sur une surface métallique.

En maintenant la puissance des irradiations UV constante à 160 mW/cm^2 et la concentration en monomère NaSS à 0.7 M , nous avons commencé par tester une activation de la surface par une ozonation de 20 min. Nous avons réalisé une cinétique de greffage en fonction du temps, en exposant les surfaces à différents temps d'irradiation (de 15 à 60 min). Nous avons obtenu la première cinétique de polymérisation de greffage, par amorçage UV, de NaSS sur des films PCL (Fig. 26).

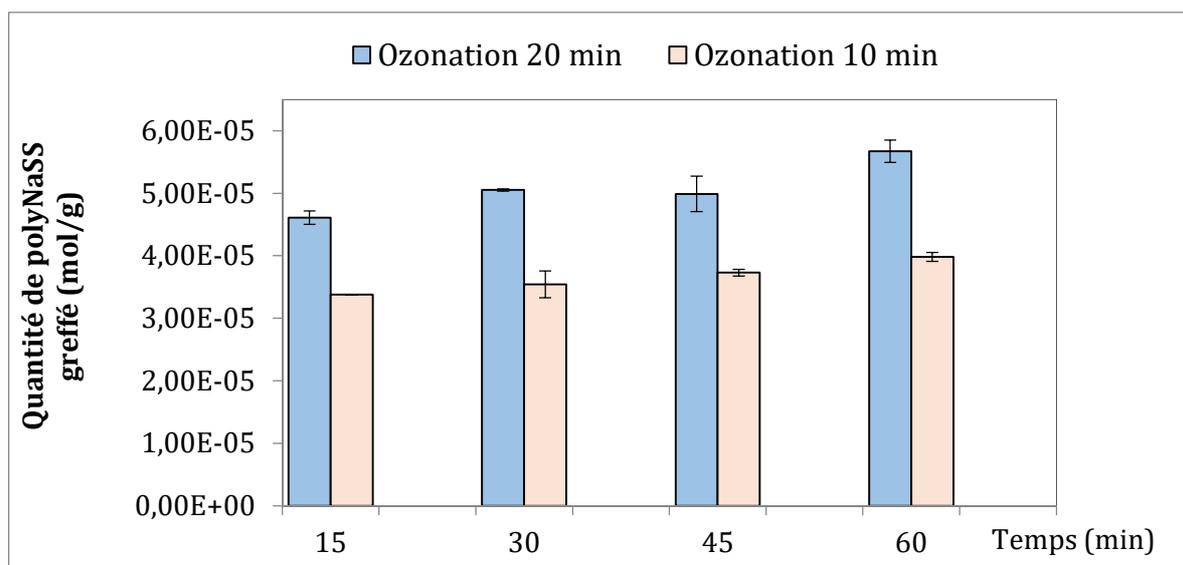


Figure 26 : Etude cinétique du greffage par amorçage UV à 160 mW/cm² avec 20 et 10 min d'ozonation à 0.7 M.

Nous avons constaté qu'un taux de greffage maximal pouvait être obtenu après 60 min d'exposition au rayonnement UV (5.67 ± 0.17) $\times 10^{-5}$ mol.g⁻¹. Nous avons aussi observé qu'après seulement 15 min d'exposition aux irradiations UV, nous avons obtenu un taux de greffage légèrement plus élevé (4.61 ± 0.10) $\times 10^{-5}$ mol.g⁻¹ que dans le cas d'un greffage thermique 3 h (3.87 ± 0.16) $\times 10^{-5}$ mol.g⁻¹.

Une autre étude cinétique à la même puissance optimale (160 mW/cm²) a également été réalisée avec un temps d'ozonation de 10 min (en maintenant la même concentration de NaSS à 0.7 M) (Fig. 26). Cela nous a permis de constater qu'avec un greffage amorcé par irradiation UV, une ozonation de 10 min (avec 60 min d'exposition aux UV) était suffisante pour atteindre le même taux de greffe (3.98 ± 0.16) $\times 10^{-5}$ mol.g⁻¹ qu'un greffage amorcé par voie thermique à 3 h avec une ozonation de 20 min.

En effet, l'efficacité de cette technique par amorçage UV, résulte d'une polymérisation plus rapide (en atteignant un taux de greffage élevé après seulement 15 min lorsque nous avons utilisé une pré-ozonation de 20 min, et 60 min lorsque nous avons utilisé une pré-ozonation de 10 min) que les études précédentes utilisant un amorçage par voie thermique (polymérisation complète en 3 h) [266].

D'autres analyses ont été effectuées pour confirmer la présence de polyNaSS sur ces surfaces de film PCL greffé par amorçage UV. Tout d'abord, comme pour les films PCL greffés thermiquement, nous avons évalué l'angle de contact (Fig. 27) : le greffage sous

irradiations UV sur les films PCL a donné un angle de contact de $15.8 \pm 2.5^\circ$ pour les films greffage sous UV pendant 60 min avec ozonation 20 min (Fig 27. b) et $28.3 \pm 4.4^\circ$ pour ceux greffés sous UV pendant 15 min avec ozonation 20 min (Fig 27. c). Pour Les films greffés sous UV pendant 60 min avec 10 min d'ozonation, nous avons noté un angle de contact de $39.6 \pm 1.7^\circ$ (Fig 27. d). La figure 27. a. présente le résultat obtenu sur des films PCL non greffés. Ces résultats suggèrent la présence des groupements sulfonates sur la surface des films PCL à des taux différents (Tableau 2).

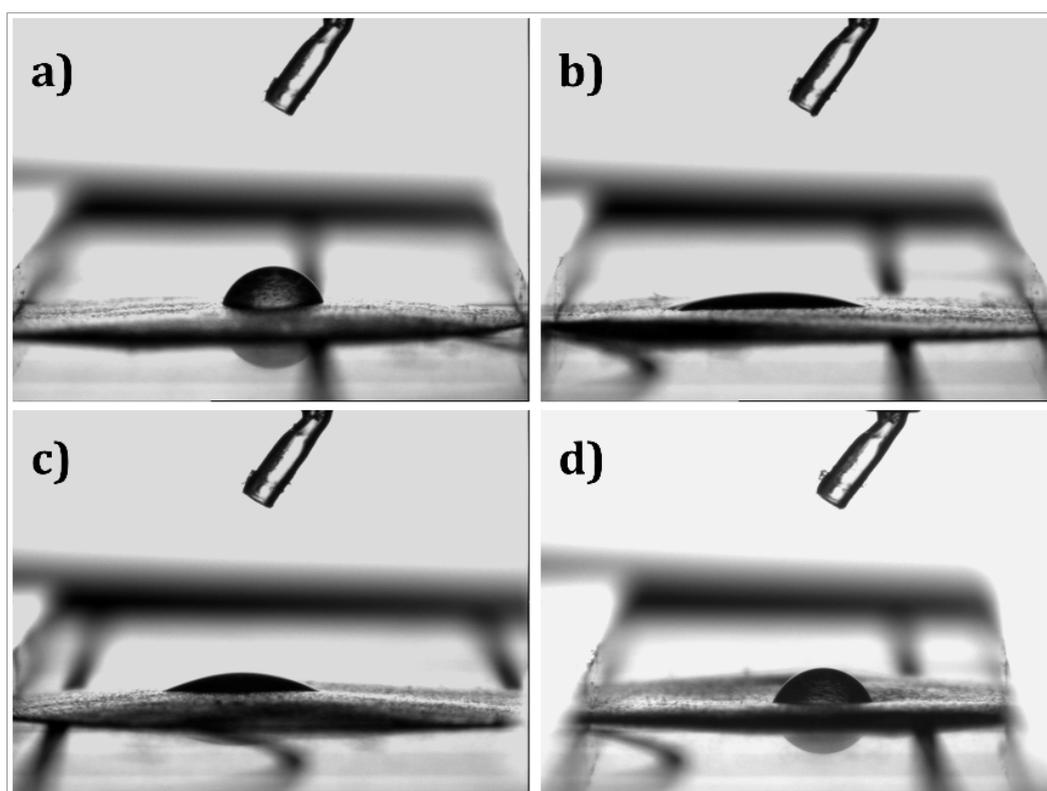


Figure 27 : (a) Film PCL non greffé, (b) greffage UV 60 min - ozonation 20 min, (c) greffage UV 15 min - ozonation 20 min, (d) greffage UV 60 min - ozonation 10 min.

Tableau 2 : Taux de greffage sous irradiations UV et angle de contact des échantillons greffé avec activation de la surface

Echantillons	Taux de greffage (mol.g^{-1})	Angle de contact ($^\circ$)
G⁸ UV 60 min - Oz 20 min	$(5.67 \pm 0.17) \times 10^{-5}$	15.8 ± 2.5
G UV 15 min - Oz 20 min	$(4.61 \pm 0.10) \times 10^{-5}$	28.3 ± 4.4
G UV 60 min - Oz 10 min	$(3.98 \pm 0.16) \times 10^{-5}$	39.6 ± 1.7

⁸ G : Greffé(e)

Les analyses FTIR ont montré sur les films PCL greffés sous irradiations UV (après activation de surface par ozonation), la présence d'un pic spécifique du polyNaSS à la surface des films.

Les spectres (Fig. 28) montrent la surface d'un film PCL non greffé et 3 films greffés avec du polyNaSS (conditions résumées dans le Tableau 2) entre 700 et 1500 cm^{-1} . Le cycle aromatique et les vibrations symétriques des groupements SO_3^- du polymère polyNaSS greffé ont généré un doublet NaSS ($\text{O}=\text{S}=\text{O}$) situé à 1013 et 1040 cm^{-1} (Tableau 3).

Ces analyses FTIR-ATR ne permettent pas de localiser tous les pics caractéristiques du polymère polyNaSS greffé à la surface des films PCL, étant donné que le PCL est un composé organique, rendant de ce fait difficile de localiser les autres pics du polyNaSS parmi tous ceux du PCL.

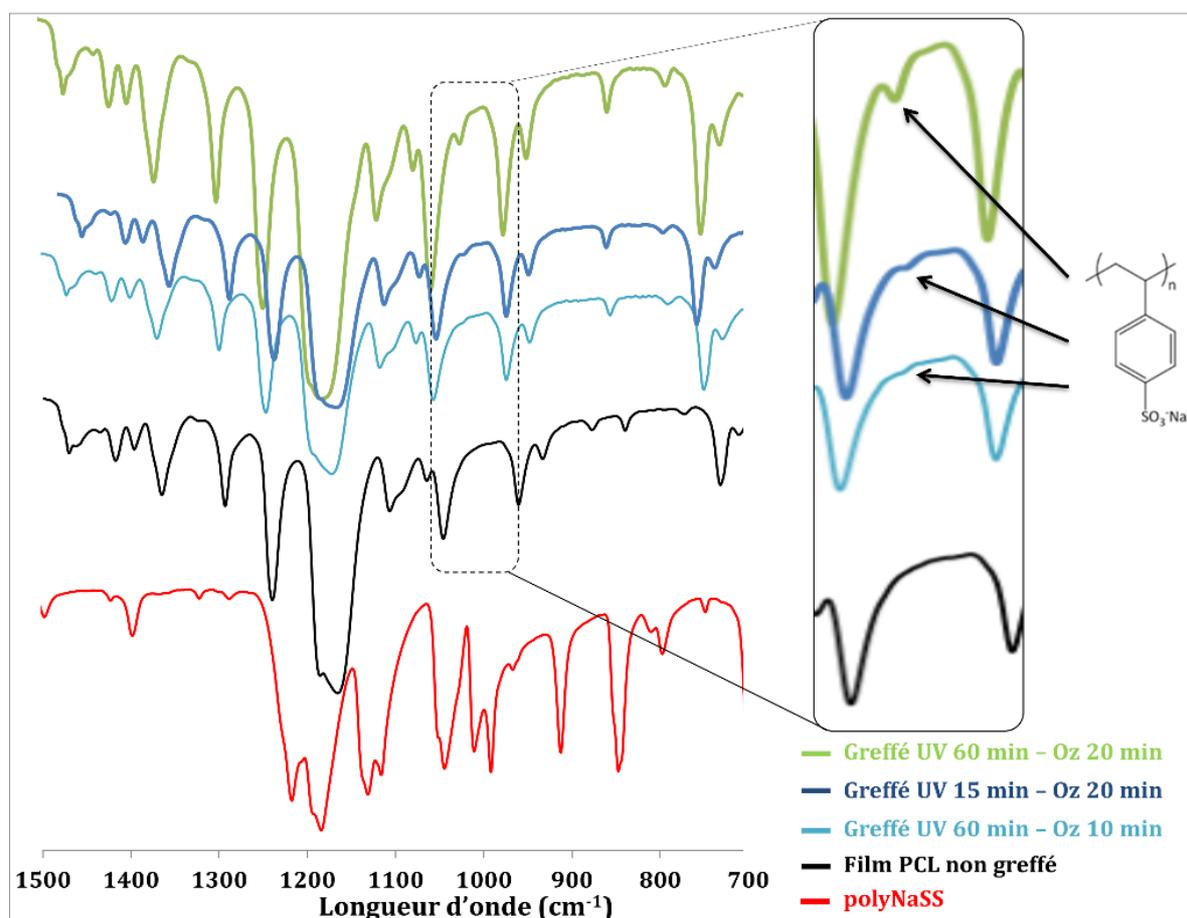


Figure 28 : Spectres FTIR-ATR des films PCL greffés polyNaSS : de haut en bas ; (vert) greffé UV 60 min - Oz 20 min, (bleu marine) Greffé UV 15 min - Oz 20 min, (cyan) greffé UV 60 min - Oz 20 min, (noir) film PCL non greffé, (rouge) polyNaSS.

Tableau 3 : Caractéristiques des bandes d'adsorption du polyNaSS

Longueur d'onde (cm ⁻¹)	Intensité des pics	Groupements chimiques & interactions
1411	Moyen	v(SO ₂)
1184-1132	Elevé	SO ₃ ⁻ (Sel)
1040	Elevé	v(O=S=O)
1013	Elevé	Cycle aromatique

L'analyse chimique des éléments par EDX a montré la présence des atomes caractéristiques du PCL (C et O). Elle a également montré la présence d'atomes de Na et de S, atomes constituant notre polymère polyNaSS greffé (Tableau 4).

Le pourcentage d'oxygène, sur les échantillons greffés, a augmenté en raison d'une part de l'étape d'activation par ozonation des échantillons permettant de générer plus d'atomes d'oxygène (PCL-OOH) (PCL-OOR) et d'autre part du greffage de polyNaSS (SO₃⁻) à la surface des échantillons.

Tableau 4 : Analyse du (%) atomique des éléments sur différents films PCL greffés polyNaSS sous UV avec activation de la surface par ozonation (Oz)

Echantillons	EDX composition atomique (%)			
	C	O	Na	S
Film PCL non greffé	81.19 ± 1.23	18.81 ± 1.66	-	-
G UV 60 min - Oz 20 min	77.44 ± 2.94	22.10 ± 1.85	0.21 ± 0.11	0.25 ± 0.14
G UV 15 min - Oz 20 min	78.25 ± 2.32	21.44 ± 0.87	0.14 ± 0.07	0.17 ± 0.06
G UV 60 min - Oz 10 min	79.07 ± 2.75	20.65 ± 1.12	0.13 ± 0.05	0.15 ± 0.03

Afin d'observer la distribution des éléments à la surface des films PCL greffés et de confirmer l'homogénéité du revêtement polyNaSS, une cartographie élémentaire a été réalisée à l'aide du système EDX (Fig. 29) sur un échantillon film PCL greffé sous irradiations UV (film PCL greffé sous UV 60 min - Oz 20 min qui présente le taux de greffage le plus élevé) (Fig. 29. a).

La même analyse a été faite pour un film PCL non greffé (Fig. 29. b); qui ne révèle pas de présence des atomes Na et S pour un film non greffé.

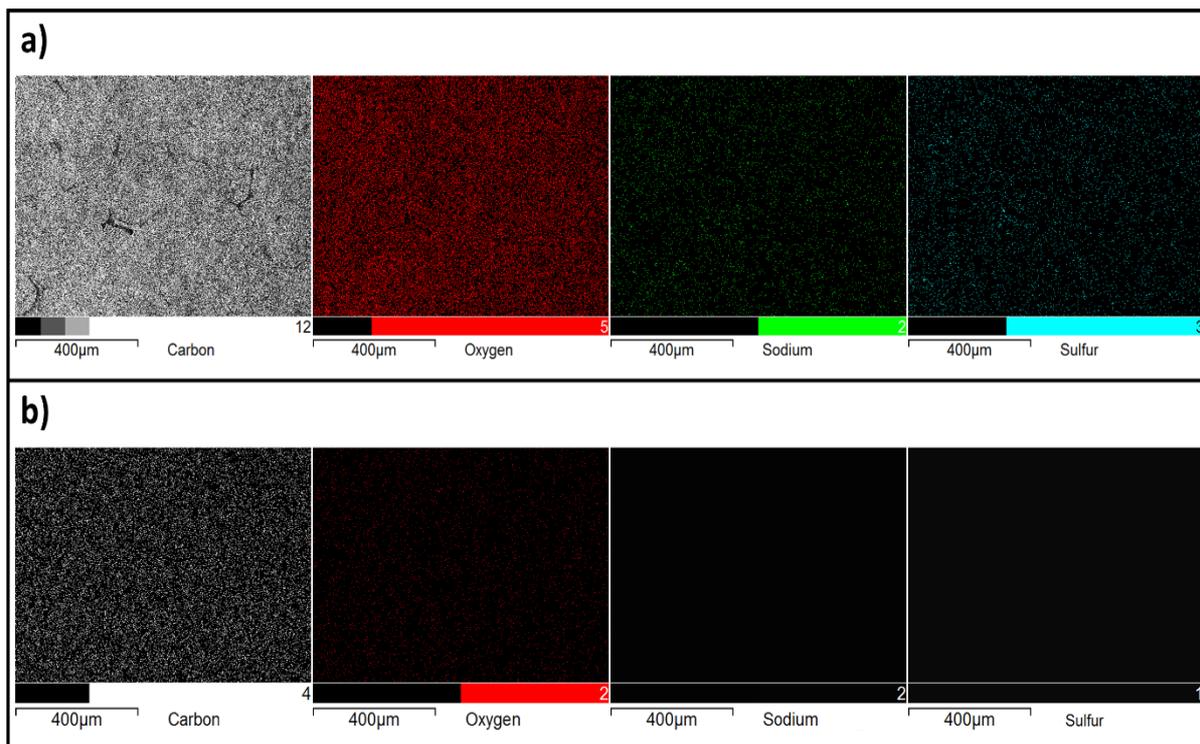


Figure 29 : Mapping/distribution des éléments sur : (a) Film PCL greffé sous UV avec activation de surface (Oz 20 min), (b) Film PCL non greffé.

3.2 Greffage de polyNaSS, sous irradiation UV, sans activation de la surface :

L'objectif de cette partie de l'étude était, en premier, de remplacer la source de radicaux (source thermique) par une source UV. Le greffage UV précédé par une étape d'activation (ozonation) de la surface des films PCL a été réalisé avec succès.

Deuxièmement, et afin d'approfondir nos recherches, nous avons exploré la possibilité d'améliorer le processus du greffage en amorçant directement les surfaces de la PCL en utilisant des irradiations UV (sans activation préalable de la surface) ; que nous avons appelé greffage UV « direct ».

Cela permettrait de réduire le nombre d'étapes de traitement et de gagner du temps, de minimiser les coûts et de prévenir tout effet nocif de l'ozonation sur la surface du PCL.

Dans la littérature, la plupart des expériences de polymérisation par greffage photo-induit ont été décrites par l'ajout de photo-amorceurs comme la benzophénone [301-302,307-308].

Différents travaux ont montré que l'irradiation UV sur les surfaces polymères peut créer des radicaux sur les surfaces polymères [309].

Nous avons décidé de tester le greffage UV « direct » de polymère bioactif sur des surfaces en PCL sans activation.

La cinétique de greffage du NaSS à partir de la surface des films de PCL sans pré-ozonation a été étudiée pour déterminer les paramètres optimaux de la réaction. Les effets des différents paramètres de la réaction tels que l'absence d'activation de surface du PCL ainsi que la concentration de la solution monomère ont été établis en corrélation avec la densité du greffage.

Nous avons commencé par réaliser une cinétique de greffage UV « direct » sans activation, en reproduisant les mêmes conditions en termes de puissance d'irradiation et de concentration de la solution monomère.

En maintenant la concentration de la solution de NaSS à 0.7 M, les films PCL ont été directement irradiés à une puissance de 160 mW/cm², en les exposant aux irradiations UV de 15 à 60 min. Nous avons observé qu'un taux de greffage optimale de greffage a été obtenue après 45 min d'exposition $(9.07 \pm 0.35) \times 10^{-6}$ mol.g⁻¹ (Fig. 30).

De plus, une seconde étude cinétique du greffage UV « direct » en réduisant la concentration monomère à 0.32 M et en maintenant le même puissance d'irradiation (160 mW/cm²), montre que la quantité de polyNaSS greffé augmente significativement (~ 30%) pour le même temps de polymérisation (45 min) comparé à celui obtenue à 0.7 M avec la même puissance d'irradiation (Fig. 30). Ce qui suggère qu'une plus grande efficacité de greffage $(1.26 \pm 0.3) \times 10^{-5}$ mol.g⁻¹ peut être obtenue à une concentration de monomère inférieure de moitié (moins de perte).

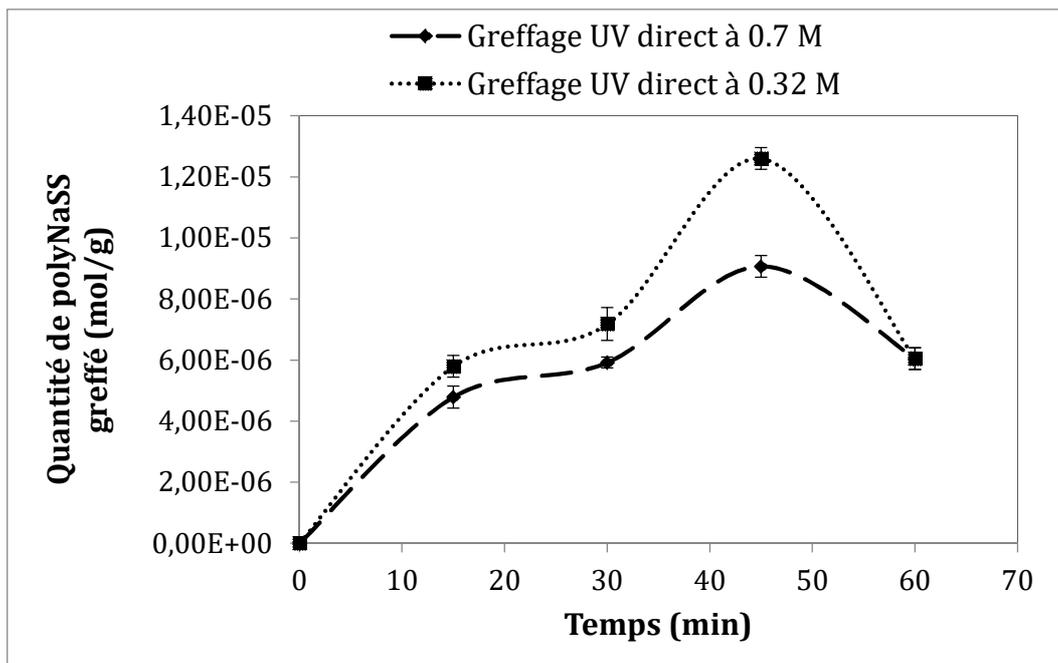


Figure 30 : Etude cinétique du greffage UV « direct », à 0.7 M et à 0.32 M, à 160 mW/cm² en fonction du temps.

Ce taux de greffage $(1.26 \pm 0.3) \times 10^{-5} \text{ mol.g}^{-1}$ obtenu sans pré-ozonation des surfaces et 0.32 M en concentration monomère est comparable à celui d'un greffage thermique de 3 h $(3.87 \pm 0.16) \times 10^{-5} \text{ mol.g}^{-1}$. L'avantage de ce procédé est qu'il ne nécessite aucune étape d'activation, une concentration de monomère divisée par deux (0.32 au lieu de 0.7 M) et un temps de réaction réduit (45 min au lieu de 3 h).

Ce résultat reste également assez proche de celui d'un greffage UV avec ozonation ; tout en supprimant complètement l'étape d'activation. On constate que l'efficacité optimale du greffage UV « direct » atteint son maximum à 45 min pour le greffage UV « direct » au lieu de 60 min pour le greffage UV avec activation de la surface par ozonation.

Le greffage UV « direct » 45 min à 0.32 M (Fig 31. a) a donné un angle de contact de $56.1 \pm 3.2^\circ$ alors que le greffage UV « direct » 45 min à 0.7 M (Fig 31. b) donne $63.4 \pm 0.9^\circ$. Ceci confirme les résultats obtenus par le dosage colorimétrique au BT, et confirme la présence de polyNaSS greffé par amorçage UV direct sans avoir eu recours à une étape d'activation.

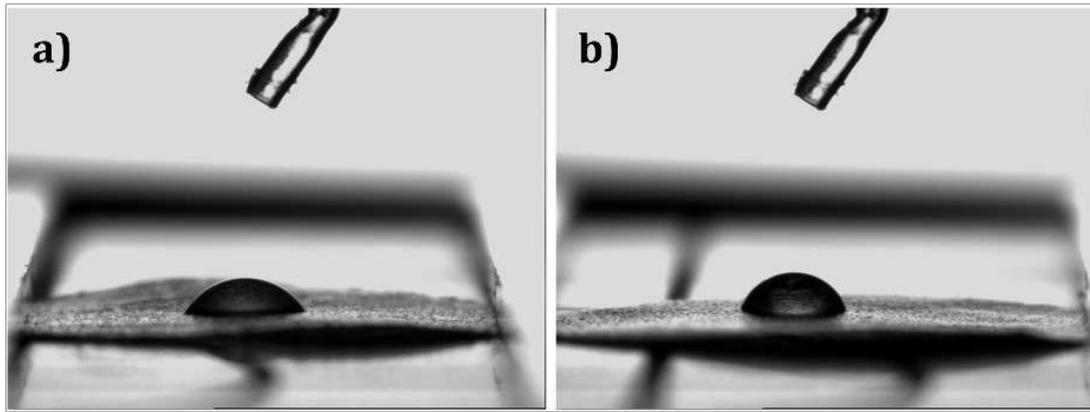


Figure 31 : (a) Greffage UV « direct » 45 min à 0.32 M, (b) Greffage UV « direct » 45 min à 0.7 M.

Les spectres FTIR des films PCL greffés par irradiation UV sans activation de surface (greffé UV « direct » 45 min à 0.32 M et greffé UV « direct » 45 min à 0.7 M) (Fig. 32) ont montré, comme pour les films greffés sous UV avec pré-ozonation (Fig. 28), la présence d'un pic spécifique du polyNaSS sur la surface, en comparaison avec les spectres des films PCL non greffés présentés ci-dessus.

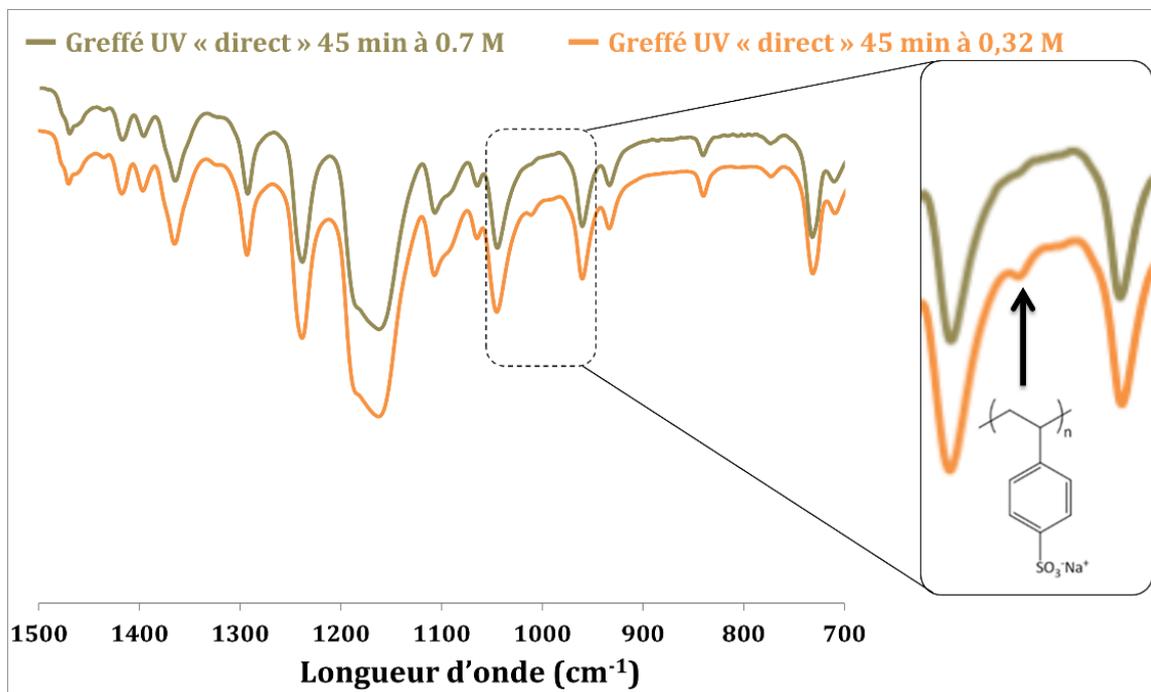


Figure 32 : Spectre FTIR-ATR de films PCL greffés polyNaSS : de haut en bas ; (brun) greffé UV direct 45 min à 0.7 M, (orange) greffé UV direct 45 min à 0.32 M.

Le pic présente une intensité plus faible que ceux du greffage sous UV avec activation de la surface, en raison de la différence d'efficacité des deux méthodes de greffage, qui est, comme attendu, plus élevée dans le cas du greffage UV avec activation, expliqué par la disponibilité d'un plus grand nombre de radicaux libres capables d'initier la polymérisation du NaSS sur les échantillons ozonés.

L'analyse chimique des éléments par EDX a montré la présence des atomes caractéristiques du PCL (C et O) sur les films greffés par amorçage UV direct. Elle a également montré la présence d'atomes de Na et de S, composés essentiels du polyNaSS greffé (Tableau 4).

Tableau 5 : Analyse du (%) atomique des éléments sur deux films PCL greffés UV direct

Echantillons	EDX composition atomique (%)			
	C	O	Na	S
G UV direct 45 min à 0.7 M	80.89 ± 1.02	18.96 ± 0.79	0.10 ± 0.05	0.05 ± 0.04
G UV direct 45 min à 0.32 M	80.33 ± 1.77	19.44 ± 1.23	0.14 ± 0.02	0.09 ± 0.03

La cartographie élémentaire a été réalisée à l'aide du système EDX sur un film PCL greffé par amorçage UV direct (film PCL greffé UV direct 45 min à 0.32 M, qui présente le taux de greffage le plus élevé pour un greffage amorcé par UV directement sans activation) (Fig. 34).

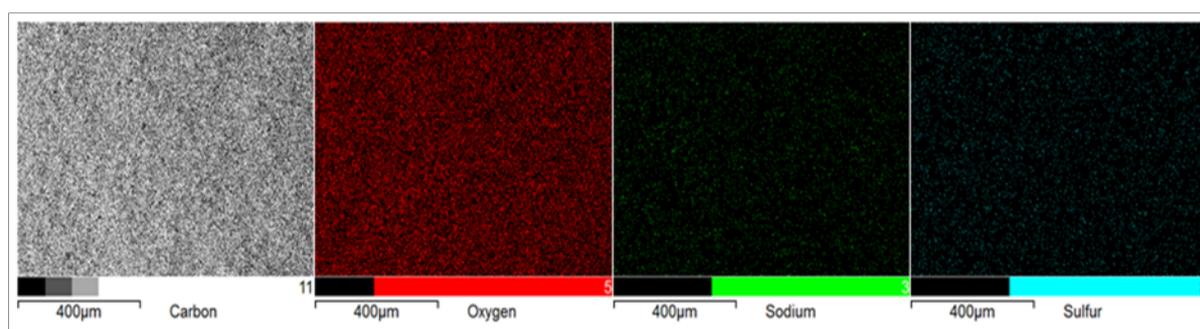


Figure 33 : Mapping/distribution des éléments sur film PCL greffé par amorçage UV sans activation de la surface, à 0.32 M.

3.3 Physisorption et stabilité du greffage :

Afin de nous assurer que les taux de greffage obtenus par les différents procédés de greffage -thermique, UV avec activation et UV direct sans activation - ne sont pas dus à une absorption ou une interaction non spécifique du monomère NaSS ou du polymère polyNaSS sur la surface du PCL, la physisorption du NaSS et du polyNaSS sur des films PCL a été étudiée.

L'essai de physisorption a été effectué en quantifiant la quantité de groupements sulfonate (monomère ou polymère) restant à la surface du film PCL après incubation dans des solutions aqueuses de NaSS et de polyNaSS.

Les films PCL ont d'abord été immergés dans des solutions aqueuses de NaSS et de polyNaSS, puis laissés à température ambiante pendant 15 à 180 min (durée de la cinétique de greffage : 15, 30, 45, 60 et 180 min). Après rinçage des échantillons pendant 48 h avec du dH₂O, la quantité de groupements sulfonates physisorbés a été déterminée par dosage colorimétrique au BT (Fig. 34).

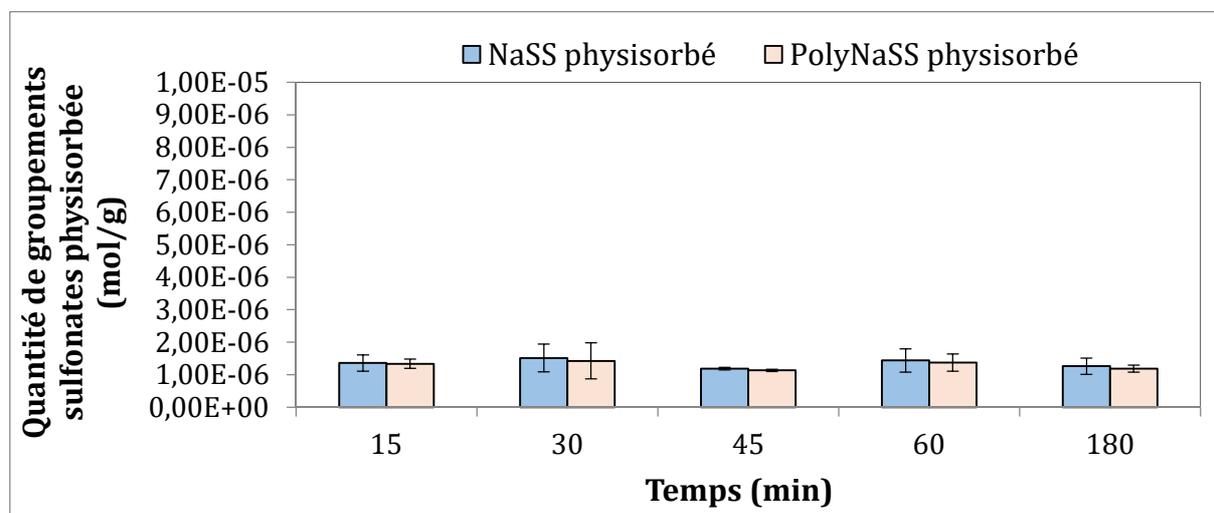


Figure 34 : Quantité de NaSS et de polyNaSS physisorbée sur les films PCL en fonction du temps après 48 h de rinçage.

Les résultats présentés à la figure 33 montrent que la quantité de physisorption du NaSS et du polyNaSS est presque similaire, ne variant que légèrement de $(1.12 \pm 0.1) \times 10^{-6}$ mol.g⁻¹ à $(1.51 \pm 0.4) \times 10^{-6}$ mol.g⁻¹ pour les différents temps d'incubation.

Nous observons que les taux de physisorption obtenus sont faibles quel que soit la durée d'incubation et ne peuvent être comparés aux taux de greffage qui sont 10 fois supérieurs.

Le deuxième objectif de ce test est de confirmer que même en laissant les échantillons incubés pendant de longues périodes dans les solutions de NaSS et de polyNaSS, le taux de physisorption reste faible. Nous avons laissé les échantillons incuber pendant 24 h dans les solutions NaSS et polyNaSS et quantifié les groupements de sulfonates physisorbés par dosage colorimétrique au BT (Fig. 35. gauche).

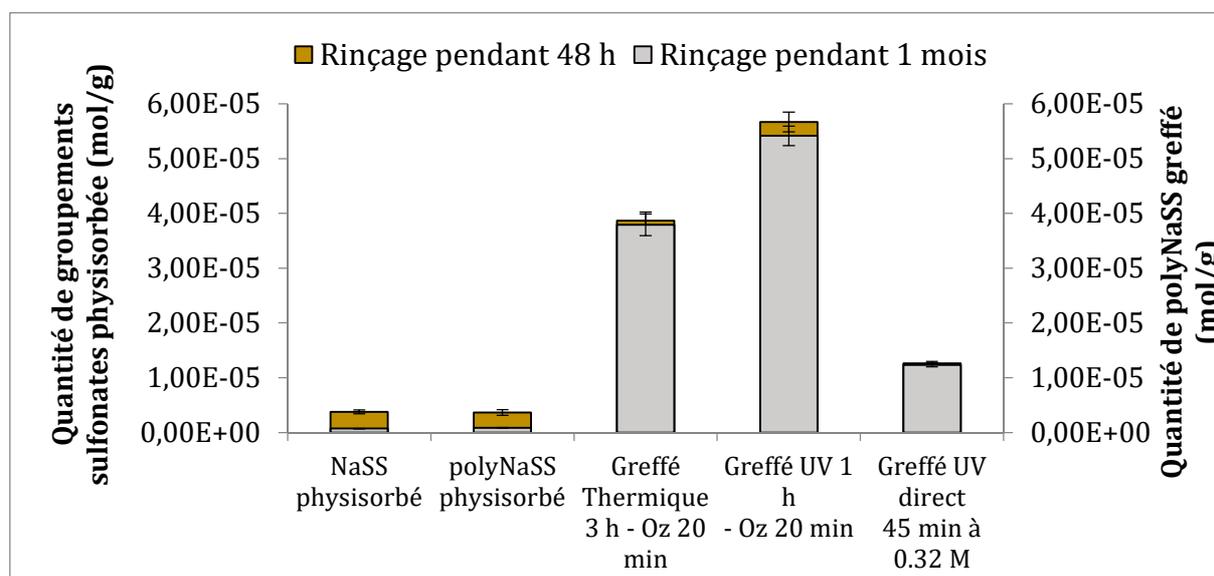


Figure 35 : (à gauche) Quantité de NaSS et de polyNaSS physisorbée sur des films PCL en fonction du temps après rinçage pendant 48 h et 1 mois, (à droite) Etude de la stabilité du greffage thermique et sous UV de polyNaSS sur la surface de films PCL après rinçage de 1 mois.

Les résultats montrent qu'un rinçage de 48 h dans du dH₂O conduit à des taux de physisorption de $(3.78 \pm 0.3) \times 10^{-6} \text{ mol.g}^{-1}$ pour le NaSS et $(3.65 \pm 0.1) \times 10^{-6} \text{ mol.g}^{-1}$ pour le polyNaSS, soit une légère augmentation par rapport au taux moyen $((1.29 \pm 0.2) \times 10^{-6} \text{ mol.g}^{-1})$ observé aux différents moments de la cinétique de physisorption (Fig. 34). Lorsque l'on augmente le temps de rinçage jusqu'à un mois, le taux de physisorption diminue sensiblement (environ 80 %).

Lorsque le polyNaSS a été greffé sur la surface des films PCL par la technique directe du « grafting from », la stabilité de la couche de polyNaSS greffée a été étudiée en quantifiant la quantité de polyNaSS greffé sur les films PCL (voir Fig. 35. droite).

Comme suit, nous avons comparé les taux de greffage observés pour des conditions optimales de greffage : greffage thermique 3 h avec ozonation 20 min, greffage UV 60 min avec ozonation 20 min et greffage UV direct 45 min à 0.32 M, après 48 h et un mois de rinçage avec dH₂O. Les résultats (Fig. 34. Droite) montrent clairement que les taux de greffage ne changent pas entre un rinçage de 48 h et un mois :

- ✓ Pour un greffage thermique de 3 h, le taux de greffage passe de $(3.87 \pm 0.16) \times 10^{-5}$ mol.g⁻¹ à $(3.79 \pm 0.19) \times 10^{-5}$ mol.g⁻¹.
- ✓ Pour un greffage UV de 60 min avec ozonation de 20 min (greffage UV avec activation de surface), le taux de greffage passe de $(5.67 \pm 0.17) \times 10^{-5}$ mol.g⁻¹ à $(5.42 \pm 0.15) \times 10^{-5}$ mol.g⁻¹.
- ✓ Pour le greffage UV direct 45 min à une concentration de monomère de 0.32 M (greffage UV direct sans activation de surface), le taux de greffage passe de $(1.26 \pm 0.3) \times 10^{-5}$ mol.g⁻¹ à $(1.23 \pm 0.2) \times 10^{-5}$ mol.g⁻¹.

Ces résultats montrent la stabilité de notre procédé de greffage de polyNaSS sur la surface PCL quelle que soit la méthode utilisée : greffage thermique, greffage UV avec activation de surface et greffage UV direct sans activation de surface. Aucune perte ou relargage de polyNaSS n'a été détectée après un mois de rinçage.

En effet, les différences entre les taux de greffage et la quantité de groupements sulfonates physisorbée enregistrée après 48 h et un mois de rinçage montrent que le greffage radicalaire de polyNaSS sur des surfaces PCL conduit à une liaison covalente et forte et non à une simple physisorption (Fig. 35).

3.4 Conclusion :

Pour cette partie de l'étude qui traite de la mise au point de greffage de polymères bioactifs sur des surfaces PCL par amorçage UV, nous avons développé une nouvelle approche de greffage radicalaire qui nous permet de greffer avec succès le polymère bioactif polyNaSS par des liaisons covalentes sur des surfaces PCL.

Les irradiations UV ont été utilisées pour :

a) Induire la décomposition d'(hydro)peroxydes de PCL en radicaux libre et initier la polymérisation radicalaire du monomère NaSS à partir de la surface.

b) Amorcer la polymérisation radicalaire du monomère NaSS directement à partir de la surface PCL.

Le temps de polymérisation, l'effet de l'activation de la surface, la puissance de la lampe UV et la concentration en monomère ont été étudiés afin d'optimiser le rendement du greffage de polyNaSS.

En utilisant différentes techniques pour vérifier la présence du polymères bioactifs à la surface PCL, cette étude a montré que l'on obtient des taux de greffage polyNaSS optimisés : (i) pour le greffage UV avec une ozonation de 20 minutes comme étape d'activation, le taux de greffage est de $(5.67 \pm 0.17) \times 10^{-5} \text{ mol.g}^{-1}$ avec une puissance des irradiations UV à 160 mW/cm^2 , avec 0.7 M en concentration monomère et une exposition aux UV de 60 minutes. (ii) pour le greffage UV direct sans activation de surface, le taux optimal est de $(1.26 \pm 0.3) \times 10^{-5} \text{ mol.g}^{-1}$ avec la même puissance (160 mW/cm^2), 0.32 M de concentration en monomère et une exposition UV de 45 minutes.

Les résultats obtenus pour le greffage UV direct (sans activation) ne sont pas aussi bons que ceux d'un greffage UV avec activation de surface (par pré-ozonation) qui présente la plus grande efficacité de greffage, mais les taux restent néanmoins proches et encourageants puisque cette technique de greffage covalent et direct nécessite moins d'étapes, moins de temps de polymérisation et moins de coûts pour le processus.

L'intérêt de ces techniques de greffage par amorçage UV (avec et sans activation) est la facilité du processus lorsqu'il est bien contrôlé.

Cette partie de l'étude a fait l'objet d'un article scientifique publié en 2018 dans *IRBM ; Innovation and Research in BioMedical engineering* [310].

IV

Elaboration, fonctionnalisation et caractérisation d'échafaudages en fibres PCL électrofilées

Ce quatrième chapitre regroupe les différents travaux réalisés pour fonctionnaliser des membranes en fibres PCL électrofilées avec un polymère bioactif (polyNaSS). Nous exposons la fabrication de différentes membranes PCL électrofilées, avec une mise au point des conditions de déposition et la validation de notre dispositif d'électrofilage fait-maison. La fonctionnalisation post-électrospinning par « grafting from » de polyNaSS de ces fibres électrofilées est présentée. Nous avons appliquée des paramètres optimaux définis dans le chapitre 3 afin d'obtenir des échafaudages biocompatible et biodégradables. Le succès de l'application de cette technique de greffage covalent sur les fibres électrofilées a été vérifié en utilisant différentes techniques de caractérisation. Dans ce chapitre, nous avons aussi réalisées des études préliminaires afin d'étudier l'effet des différentes étapes de fonctionnalisation sur les propriétés du polymère. Enfin, une appréciation des propriétés mécaniques de ces échafaudages en fibres PCL électrofilées a été réalisée.

Au cours des dernières années, l'électrofilage, une technique largement utilisée qui permet de réaliser des structures poreuses en fibres ayant des dimensions allant de l'échelle micrométrique à l'échelle nanoscopique, a offert de nombreuses possibilités d'adapter différentes propriétés physiques, chimiques et biologiques d'un matériau pour des applications biomédicales.

Grâce à sa facilité de fabrication, sa polyvalence et son adaptabilité, l'électrofilage a été utilisé dans de nombreux domaines, incluant des applications biomédicales et pharmaceutiques, ainsi que dans d'autres applications telles que la filtration, les absorbants d'extraction en phase solide, les tissus imperméables, les applications énergétiques, les immunoessais ou immunodosages par biocapteurs, l'immobilisation enzymatique, l'adsorption acoustique et les tapis antifongiques.

Ce procédé a été largement étudié en ingénierie tissulaire pour générer des structures en fibres à base de différents polymères biocompatibles et biodégradables et pour produire des échafaudages qui peuvent posséder des caractéristiques fondamentales telles que biocompatibilité, non-toxicité, porosité et des propriétés mécaniques suffisantes en fonction des applications visées.

L'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative ont été les applications les plus étudiées dans le domaine biomédical. En effet, la formation d'une bio-matrice biocompatible et biodégradable en trois dimensions composée à la fois d'un biomatériau et de cellules du corps humain est le principal intérêt des techniques d'électrofilage dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, puisque cela peut imiter les tissus humains qui sont composés de structures en fibres nanométriques sur lesquelles les cellules peuvent se fixer, s'organiser et se développer. Les membranes électrofilées ont été utilisées en ingénierie tissulaire pour les prothèses vasculaires, la régénération tissulaire cardiaque, les échafaudages d'expansion cellulaire, la protection des cellules de protection contre le stress oxydatif, la reconstruction osseuse, le cartilage, la régénération du tissu nerveux et la peau.

De nombreux polymères sont utilisés en électrofilage pour diverses applications, notamment biomédicales. Parmi ces polymères, le Polycaprolactone (PCL), dont l'utilisation est largement documentée, en raison de ses excellentes propriétés

mécaniques et de sa lente dégradation qui en font un matériau adapté aux applications en ingénierie tissulaire.

L'interaction entre la surface des biomatériaux et les cellules est cruciale pour les dispositifs biomédicaux. L'une des propriétés physico-chimiques les plus importantes d'un biomatériau est la mouillabilité de surface car elle permet de moduler l'adsorption des protéines et le comportement cellulaire qui en résulte. Face à la nature hydrophobe du PCL qui conduit à un manque de réponse cellulaire favorable, différentes stratégies ont été établies dans les approches d'ingénierie tissulaire.

La technique de l' « électrospinning » ou électrofilage a prouvé son efficacité et son adaptabilité dans l'élaboration de structures tridimensionnelles biomimétiques pour l'ingénierie tissulaire. Cependant, un défi majeur consiste en la (bio)fonctionnalisation des matériaux par diverses molécules telles que des polymères bioactifs, des protéines, des sucres ou encore des particules minérales afin d'améliorer la prolifération et le développement cellulaire mais aussi pour permettre de guider leur différenciation sur la charpente avant implantation. C'est dans la perspective d'élaborer un matériau non seulement capable de supporter la colonisation cellulaire mais également doté d'une activité biologique que nous avons effectué une fonctionnalisation post-électrospinning par greffage covalent de polymères bioactifs. Ainsi, comme décrit dans le chapitre précédent, nous avons développé une technique permettant de greffer, sous irradiations UV, de façon covalente des polymères bioactifs à la surface du polymère PCL [310].

L'étude des paramètres de la réaction de polymérisation sous irradiation UV nous a permis de déterminer les paramètres optimaux que nous allons utiliser, dans ce chapitre, pour appliquer cette technique de greffage afin de fonctionnaliser, par modification chimique post-électrofilage, des échafaudages en fibres PCL électrofilées.

4.1 Préparation des échafaudages en fibres PCL électrofilées :

4.1.1 Mise au point des conditions pour la déposition de fibres électrofilées :

Dans l'optique d'obtenir des fibres de polymères homogènes et sans défaut par « électrospinning », il est important de contrôler deux paramètres : la viscosité de la solution, mais aussi et surtout, sa conductivité afin que les forces électrostatiques

surmontent les forces de tension de surface appliquées. Afin de répondre au mieux à ces phénomènes, nous avons utilisé un système de solvants consistant en un mélange CF/DMF du fait des propriétés de conduction différentes de ces deux solvants.

L'utilisation du chloroforme (CF) comme solvant pour l'élaboration de matériaux tridimensionnels par « électrospinning » conduit à la formation de structures microfibreuses avec des diamètres de fibre de plusieurs micromètres. Il est possible de réduire le diamètre moyen des fibres en augmentant la conductivité de la solution.

Dans cette perspective, nous avons utilisé un mélange de solvants par l'addition du DMF au chloroforme dans les proportions variées que nous allons détailler par la suite. La conductivité de la solution a ainsi été considérablement augmentée en raison de la forte constante diélectrique du Diméthylformamide (DMF) (constante diélectrique = 38.3), ce qui a permis aux forces électrostatiques exercées par le voltage, d'être plus efficaces, en étirant davantage les fibres de polymère, menant alors à la formation de structures homogènes sans perles et au diamètre de fibres plus faible.

Dans ce système de solvants, nous avons solubilisé le PCL ($M_n = 80,000 \text{ g mol}^{-1}$) à différentes concentrations (10 %, 13 %, 15 %, 18 % et 20 %) dans le but d'obtenir un jet stable dans le temps et par conséquent un procédé continu. Plusieurs essais, en commençant avec un dispositif d'électrofilage dépourvu d'enceinte en plexiglas (qui évite tout risque lié au courant électrique et évite les phénomènes électriques parasites, ainsi que toute perturbation de courant d'air) ont été effectués pour déterminer les conditions adéquates de déposition.

Sans toutefois entrer dans le détail de tous les tests réalisés pour la mise au point des conditions de déposition, l'absence d'une enceinte a été contraignante pour l'obtention de fibres électrofilées homogènes, sans perles et a de ce fait empêché la reproduction des résultats.

La tension appliquée, le diamètre de l'aiguille de filage, la concentration de la solution PCL, la distance entre la pointe de l'aiguille et le collecteur ainsi que le débit de la solution polymère au travers de l'aiguille sont tous des paramètres que nous avons étudiés afin d'appréhender au mieux l'influence de ces différents paramètres sur la morphologie des fibres, leur homogénéité, l'absence de perles et la reproductibilité des résultats.

La durée de déposition qui est un paramètre qui influe sur l'épaisseur de la membrane formée, a été étudié. Des temps de déposition courts (< 60 min) ont produit des membranes très fines dont la manipulation est difficile car elles sont très électrostatiques, mais aussi parce qu'une faible épaisseur de la membrane ne permet pas la bonne tenue du processus de fonctionnalisation qui fait appel à différents étapes ; notamment l'ozonation et l'agitation des échantillons dans la solution de monomère.

Une des autres considérations à prendre en compte concernant la durée de déposition, est l'étude des propriétés mécaniques sur ces membranes en fibres électrofilées, qui nécessite aussi une épaisseur des membranes adéquate. Une déposition de 2 h a permis la fabrication de membranes ayant une épaisseur idéale pour la manipulation ainsi que la fonctionnalisation de ces membranes. Les temps de déposition supérieurs à 2 h n'ont pas été retenus, car au bout d'un certain temps de déposition, les fibres isolent électriquement le collecteur réduisant l'efficacité de la déposition.

La Figure 36, présente quelques exemples, pour ne présenter que ceux-là, sur les tests réalisés pour mettre au point des conditions adéquates pour la déposition de fibres électrofilées. Les différents paramètres de ces tests ne sont pas tous détaillés dans cette étude, puisqu'ils sont déjà largement documentés dans la littérature et que l'objectif principal de cette étude reste la fonctionnalisation des fibres électrofilées et non l'étude des paramètres influençant le procédé d'électrofilage.

L'effet de la concentration de la solution sur le diamètre des fibres a été largement étudié pour un grand nombre de systèmes (voir ; paramètres de la solution dans Effets de différents paramètres sur le processus d'électrofilage). L'expérimentateur, en changeant la concentration de la solution, fait principalement varier la viscosité de celle-ci. La viscosité de la solution est le paramètre clé afin de régler le diamètre et la morphologie des fibres. Le diamètre des fibres PCL a été ajusté de façon précise en variant la concentration, le type de solvant et le ratio du mélange [48]. La viscosité de la solution est liée essentiellement à ces paramètres. Ainsi, leur contrôle précis est nécessaire pour maîtriser le procédé d'électrospinning et diminuer l'impact des facteurs de perturbations amoindrissant la reproductibilité du système.

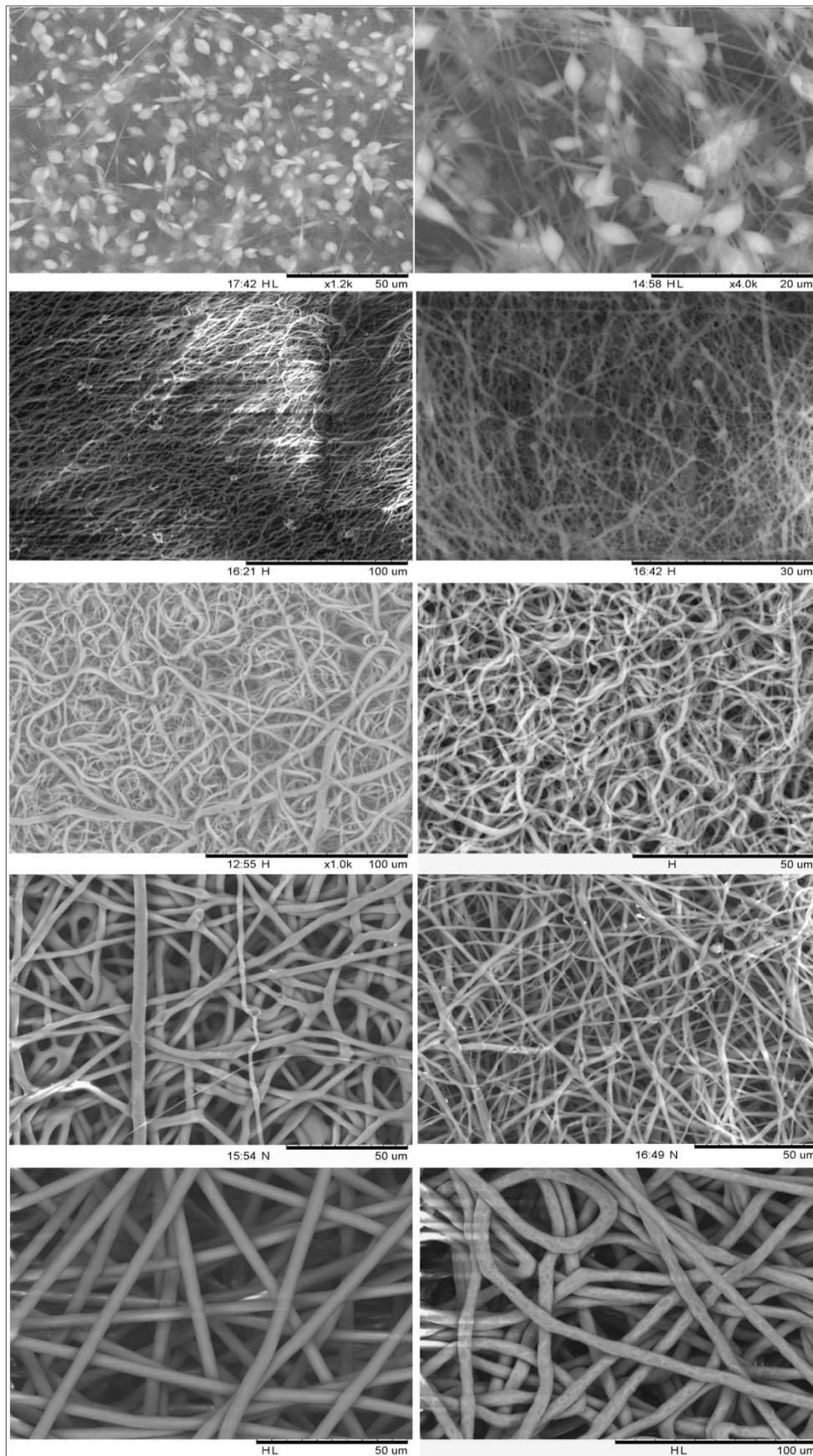


Figure 36 : Etude des paramètres d'électrofilage dans le cadre de la mise au point de conditions adéquates pour la déposition de fibres électrofilées.

Lorsque dans un mélange CF/DMF, la teneur en DMF, non-solvant de la PCL, est diminuée, la viscosité augmente ce qui a pour impact d'augmenter le diamètre moyen des fibres. Il existe aussi une autre explication à ce phénomène.

L'emploi de DMF permet d'obtenir une solution possédant une conductivité et une constante diélectrique beaucoup plus élevées que la même solution sans DMF. La conductivité étant accrue, la quantité de charges dans le jet est plus importante ce qui provoquera un plus grand étirement de ce dernier, engendrant alors des fibres de petits diamètres. Lorsqu'on diminue la teneur en DMF, l'effet inverse est obtenu.

Le contrôle de la viscosité de la solution passe par la maîtrise de différentes conditions : le choix du solvant ou du mélange de solvants, la masse molaire du polymère, la concentration de la solution. On peut ajuster assez précisément le diamètre des fibres déposées. Dans ce travail, en changeant les concentrations des solutions, il a été possible d'obtenir des fibres dont le diamètre varie du nanomètre à plusieurs micromètres.

La variation de la distance de déposition permet uniquement, dans nos expériences, de stabiliser le jet de la solution polymère en ajustant la distance en fonction de la concentration utilisée. En théorie, plus la distance de déposition est élevée, plus le temps de vol des fibres est grand pour une même accélération. Ainsi, les fibres obtenues devraient avoir un diamètre plus petit.

Expérimentalement, il a été observé que lorsque la distance de déposition est augmentée, il arrive qu'à partir de 25 et 30 cm, la tension ne soit plus assez importante pour qu'un cône de Taylor se forme. Aussi, le procédé est fortement perturbé, le jet est discontinu. D'autre part, le jet pour les faibles distances subit d'une part, une forte accélération qui devrait étirer plus le jet et produire des fibres petites et d'autre part, un temps de vol court qui limite son étirement. Pour les plus grandes distances, le jet subit une accélération plus petite donc un jet plus gros mais puisque le temps de vol est plus grand, le jet a le temps d'être plus étiré.

Ainsi ces deux phénomènes se retrouvent en concurrence et leurs effets semblent se moyenner puisque le diamètre des fibres est constant.

La tension et la distance de déposition influent essentiellement sur le temps de vol des fibres. Ainsi, lorsque les temps de vols restent proches, peu d'effets sont observables.

Néanmoins, l'influence de ces paramètres reste assez difficile à mettre en évidence et aucune règle n'a été clairement établie.

4.1.2 Production des échafaudages en PCL électrofilée pour cette étude :

L'obtention des échafaudages en fibres PCL électrofilées a été réalisée après les différents tests effectués sur les différents paramètres. Parmi les différentes membranes obtenues, deux d'entre elles ont été retenues comme candidates pour cette étude.

4.1.2.1 Conditions de déposition :

Le Tableau 6 présente les différentes conditions de déposition de ces deux membranes en PCL électrofilée. Le diamètre de l'aiguille de filage utilisée pour les deux membranes est de 20 G (0.9 mm). Ces deux membranes ont été réalisées avec le prototype final de notre dispositif d'électrofilage.

Tableau 6 : Conditions de déposition pour la production des échafaudages en fibres PCL électrofilées

	Membrane A : membrane μm	Membrane B : membrane nm
Système de solvants	CF/DMF (90/10 , v/v)	CF/DMF (70/30 , v/v)
Concentration	15 % (p/v)	13 % (p/v)
Tension appliquée	9 kV	13 kV
Débit de la solution	2 mL.h ⁻¹	3 mL.h ⁻¹
Distance	20 cm	12 cm
Durée de déposition	120 min	90 min

Le principe de la déposition reste relativement simple. Le matériel employé reste basique, et dans notre étude, il est constitué par un pousse-seringue, une seringue, un cathéter spécifique, une aiguille et une alimentation haute-tension. Le principe du procédé est le suivant : une solution de polymère est acheminée d'un réservoir (généralement, une seringue) vers une aiguille où un champ électrostatique de plusieurs kV est appliqué. Sous l'effet des forces électrostatiques se créant au sein de la solution polymère, la goutte de polymère, en sortie de l'aiguille, s'allonge formant un cône dit de

Taylor. Si le champ a atteint une valeur seuil, les forces électrostatiques vont vaincre les forces de tension de surface de la goutte de polymère provoquant la formation d'un jet. La formation de ce jet est principalement due au mouvement des charges libres à la surface et dans la solution de polymère. En d'autres mots, la force de traction s'appliquant sur le polymère en solution, générée par ce procédé, provient des interactions électriques entre le champ externe appliqué et les charges électriques contenues et acheminées par le jet. Lorsque les charges libres de la solution de polymère migrent en réponse au champ électrostatique, elles transfèrent très rapidement une force au polymère et provoquent la déformation du jet.

L'accélération du polymère a lieu par l'intermédiaire d'un transfert de force le long du jet qui possède alors un comportement viscoélastique. Les paramètres viscoélastiques de ce fluide sont dépendants du temps, puisque le solvant s'évapore pendant la déposition. En effet, au début du jet le polymère est en solution et se comporte comme un fluide d'un point de vue mécanique. Ensuite, et au fur et à mesure que le solvant s'évapore, la viscosité du fluide augmente et l'on tend à atteindre l'état solide. Les charges dans le jet sont responsables du transport du polymère dans la direction du champ et vers le collecteur. Cela constitue le mécanisme par lequel les charges atteignent le collecteur bouclant ainsi le circuit électrique. Cependant, avant que les fibres aient pu être déposées, le jet subit une instabilité. Cette instabilité provoque la courbure du jet et son étirement, et conséquemment le diamètre du jet décroît. A partir de ce moment, on peut considérer le jet comme une solution extrêmement visqueuse. Le jet se dépose ensuite sur le collecteur.

Les fibres obtenues peuvent être « mouillées » si la distance entre le collecteur et l'aiguille est petite, le solvant n'ayant pas le temps de s'évaporer, ce qui influera sur la morphologie et les propriétés mécaniques des membranes.

Pour la déposition de nos membranes, nous avons procédé comme suit :

Pour commencer, nous avons introduit la solution polymère dans une seringue de 10 cc, puis nous avons raccordé sur le bout de la seringue un tuyau (sorte de cathéter) pour transporter la solution polymère vers l'aiguille fixée à la verticale sur un support. La seringue est ensuite mise en place sur le pousse-seringue. Nous avons ensuite défini le débit de la solution souhaité et avons mis en route le pousse-seringue pour commencer à

éjecter la solution. Au moment où la solution commence à sortir de la pointe de l'aiguille, nous arrêtons l'injection.

Suite à cela, nous définissons les autres paramètres de déposition, à savoir ; régler la génératrice sur la tension souhaitée et nous installons l'aiguille à la distance souhaitée par rapport au collecteur en ajustant le support. Sur le collecteur (plaque métallique), nous installons du papier aluminium qui vient recouvrir toute la plaque afin de collecter les fibres déposées. Enfin, nous remettons le couvercle du caisson en plexiglass et mettons en route le pousse-seringue et la génératrice de tension, et les fibres commencent à se déposer. La hotte sorbonne est allumée pour évacuer les vapeurs de solvants.

A la fin de la période de déposition, nous éteignons notre dispositif et récupérons les membranes déposées sur le papier aluminium.

Les deux membranes produites ont été nommées ; « membrane μm » (micrométrique) pour la première, puisque la totalité des fibres électrofilées constituant cette membrane présentent un diamètre de l'ordre du micromètre (diamètre $> 1 \mu\text{m}$). La deuxième quant à elle a été nommée « membrane nm » (nanométrique), présentant des fibres avec un diamètre inférieur aux fibres de la première membrane, elle a été nommée ainsi car même si elle présente un mélange de fibres micro et nanométriques, il y a une claire prédominance des fibres nanométriques (avec un diamètre $< 1 \mu\text{m}$).

4.1.2.2 Morphologie des membranes de PCL électrofilée :

L'observation morphologique a été réalisée par microscopie électronique à balayage. Aucune préparation préalable n'a été utilisée pour l'observation sous MEB. Un microscope Hitachi TM3000, en utilisant le mode de tension « Analay », a été utilisé pour les observations. Le diamètre des fibres et la taille des pores a été mesuré à partir des clichés obtenus pendant les séances d'observation et ce pour chaque condition de déposition.

Afin d'obtenir des données statistiques, 50 mesures au minimum sont effectuées par membrane. La taille moyenne des pores a été déterminée en mesurant le diamètre d'une sphère virtuelle entre les fibres d'un même plan ou d'un plan proche. Toutes les mesures ont été réalisées en utilisant le logiciel « Image J ».

La morphologie des deux membranes ainsi obtenues est présentée dans les Figures 37 et 38. Les conditions de déposition ont été optimisées pour obtenir un étirement continu des fibres, ainsi que des fibres PCL uniformes sans perles.

Dans la performance biologique des échafaudages en fibres électrofilées, le diamètre des fibres et le diamètre des pores ont un rôle primordial à jouer car ils modulent les interactions cellule-cellule et cellule-membrane. Une taille de pore adéquate (porosité élevée) et un réseau de pores interconnectés sont des critères essentiels pour l'ingénierie tissulaire car ils permettent une meilleure infiltration et vascularisation des tissus [311].

Dans ce travail, à partir des micrographies MEB, une distribution du diamètre des fibres et un diamètre moyen des fibres ont été déterminés à partir d'un minimum de 50 fibres.

4.1.2.2.1 Membrane « μm » :

Pour cette membrane (Fig. 37), toutes les fibres PCL présentent une taille micrométrique ($> 1 \mu\text{m}$) et le diamètre moyen des fibres a été mesuré à $3.28 \mu\text{m} \pm 0.3$ avec une distribution du diamètre étroite qui va de $2.8 \mu\text{m}$ à $3.8 \mu\text{m}$. De plus, nous avons mesuré la taille des pores comme expliqué ci-dessus. Pour cette membrane, la taille des pores varie de $6 \mu\text{m}$ à $30 \mu\text{m}$. Grâce aux paramètres d'électrofilage optimisés, nous avons obtenu des pores uniformes avec un diamètre de pore assez grand pour une membrane en fibres électrofilées destinée à l'ingénierie tissulaire, dans le but d'améliorer la pénétration cellulaire.

Enfin, nous pouvons observer que les fibres traversent les différents plans sans qu'elles ne fusionnent entre elles (illustré avec les flèches sur la Fig. 37. Membrane μm).

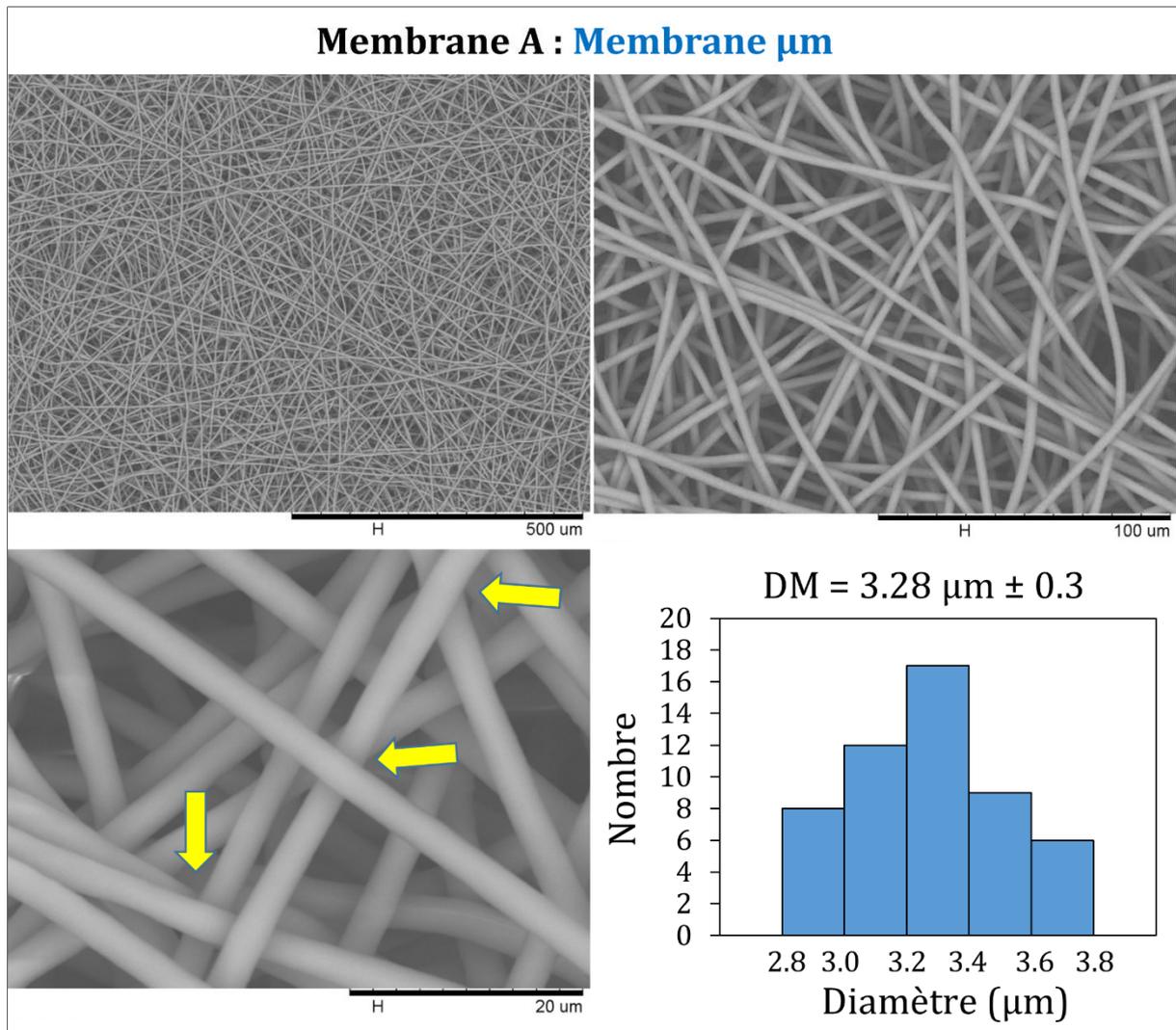


Figure 37 : Micrographies MEB de la membrane « μm » en fibres PCL électrofilées à différents grossissements et histogrammes de la distribution du diamètre des fibres.

4.1.2.2.2 Membrane « nm » :

Pour cette deuxième membrane (Fig. 38), nous pouvons observer sur les micrographies MEB la présence d'un mélange de taille des fibres avec une distribution assez large par rapport à la membrane « μm », avec une prédominance des fibres nanométriques (avec un diamètre $< 1\mu\text{m}$).

Le diamètre moyen des fibres a été mesuré à $0.72\ \mu\text{m} \pm 0.34$, diminuant de ce fait le diamètre des pores pour cette membrane. La taille des pores est plus étroite, et varie de $1\ \mu\text{m}$ à $8\ \mu\text{m}$.

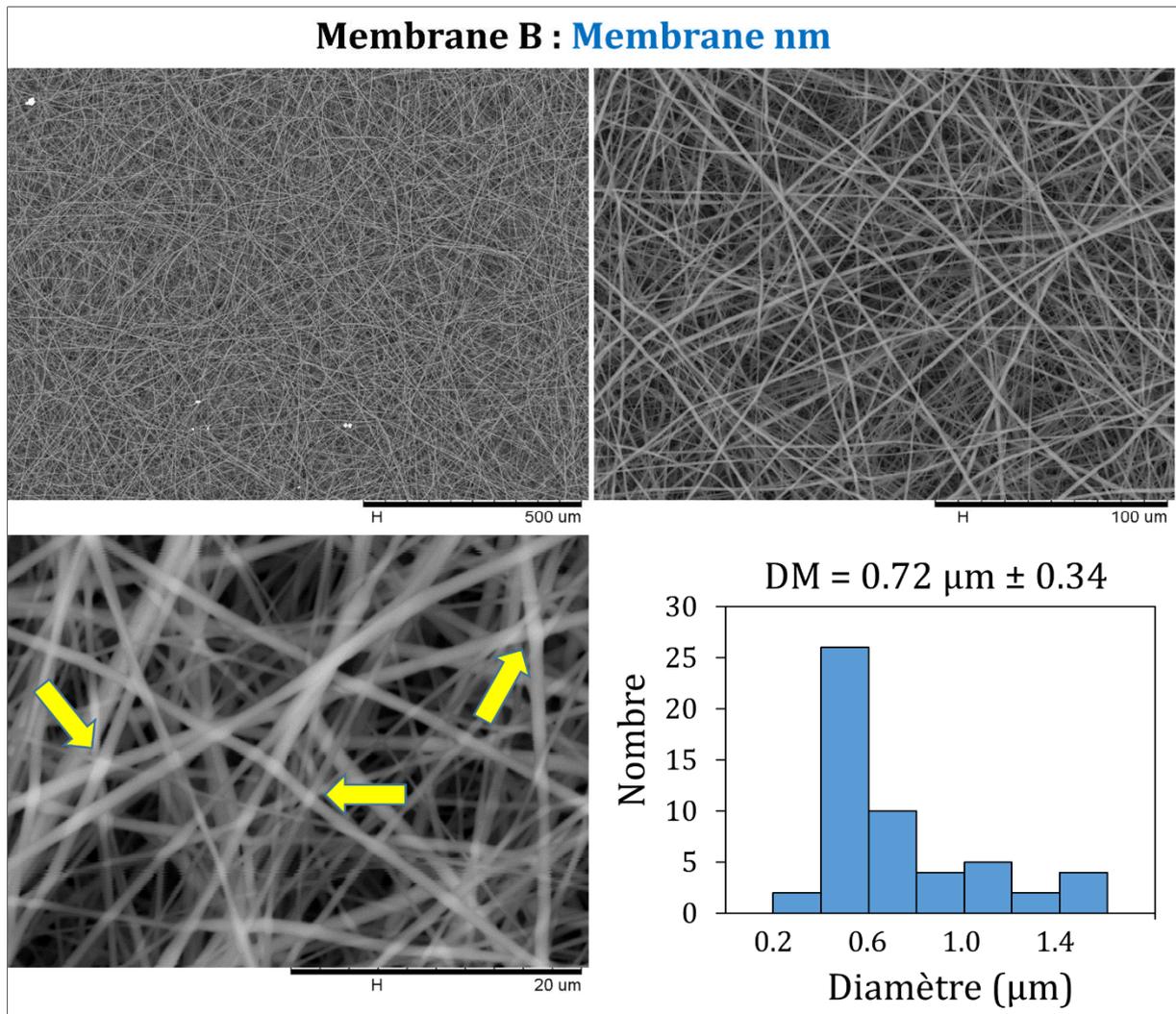


Figure 38 : Micrographies MEB de la membrane « nm » en fibres PCL électrofilées à différents grossissements et histogrammes de la distribution du diamètre des fibres.

La morphologie du tapis fibreux a été affectée par l'augmentation du débit. En effet, pour la déposition de cette deuxième membrane, une distance de 12 cm entre la pointe de l'aiguille et le collecteur a été utilisée avec un débit plus élevé (3 mL.h^{-1}), par conséquent, le jet formé nécessite plus de temps pour sécher. Le solvant n'a pas le temps de s'évaporer aussi rapidement que lors de la déposition à une distance de 20 cm.

Les fibres déposées ainsi peuvent fusionner aux points de contact formant ainsi une membrane dont les propriétés mécaniques sont accrues (illustré avec les flèches sur la Fig. 38. Membrane nm). Ce même phénomène peut également être obtenu en utilisant une solution plus diluée ou bien en réduisant la distance entre le collecteur et l'aiguille [88].

Remarque : la déposition de la deuxième membrane s'est avérée quelques fois impossible à cause des paramètres ambiants, rendant le jet de la solution instable, empêchant la reproductibilité des résultats. Cependant, de manière générale, les résultats sont reproductibles et permettent d'obtenir des fibres de qualité.

Ces expériences ont montré que, bien que se heurtant à certaines difficultés, la déposition de fibres électrofilées avec un dispositif conçu et développé au laboratoire, a été satisfaisante et ce dispositif expérimental permet d'obtenir les résultats escomptés.

Les membranes en fibre PCL électrofilée sont séchées pendant une nuit à température ambiante sous hotte sorbonne pour éliminer le solvant, et de petits disques de 16 mm ± 0,5 mm de diamètre sont coupés pour servir d'échantillons pour les expériences de fonctionnalisation.

4.2 Fonctionnalisation sous irradiation UV d'échafaudages en fibres PCL électrofilées, par le greffage covalent d'un polymère bioactif (polyNaSS) :

Au cours de ces dernières années, la bio-fonctionnalisation de fibres de polymère destinées à des applications dans le domaine de l'ingénierie tissulaire a été essentiellement réalisée par « coating », « co-électrospinning » ou encore par traitement plasma.

Cependant, il existe très peu de travaux relatifs au greffage covalent de protéines ou d'autres biomolécules capables de générer une activité biologique. Dans cette optique, nous avons réalisé une fonctionnalisation post-électrofilage par « grafting from » amorcé par irradiations UV sur des fibres PCL électrofilées.

Le processus de « grafting from » comprend le greffage par voie thermique et le greffage amorcé sous irradiation UV. Comme montré précédemment dans des études réalisées au laboratoire LBPS, la polymérisation radicalaire permet le greffage covalent de polymères bioactifs sur des surfaces de PCL. Cette technique nécessite, pour un rendement maximal du greffage, l'activation de la surface PCL par la création d'une couche superficielle d'(hydro)peroxydes PCL par un générateur d'ozone. Par la suite, les surfaces PCL sont immergées dans une solution aqueuse de monomère NaSS, et en chauffant la solution ou en l'irradiant avec de la lumière UV, la décomposition des

radicaux (hydro)peroxydes PCL a été induite et ces radicaux initient la polymérisation du NaSS. Récemment, nous avons démontré la possibilité de greffer des polymères ioniques directement sur la surface du PCL sans activation préalable de la surface [310], ce greffage UV « direct » sans activation de la surface PCL nous a permis d'améliorer le processus de greffage UV en éliminant l'étape d'activation.

L'optimisation de l'efficacité du greffage de polyNaSS sur les surfaces PCL a été explorée en étudiant les paramètres de la réaction et des conditions optimales ont été établies.

Dans cette partie de l'étude, nous avons appliqué les conditions précédemment établies sur le greffage de polyNaSS sur surfaces PCL pour fonctionnaliser des échafaudages en fibres PCL électrofilées. Le greffage covalent de polyNaSS sur la surface de ces échafaudages a été réalisé en utilisant la technique du « grafting from » représentée dans la Figure 39. A noter que le schéma (Fig. 39) ne représente pas la technique de greffage UV « direct ».

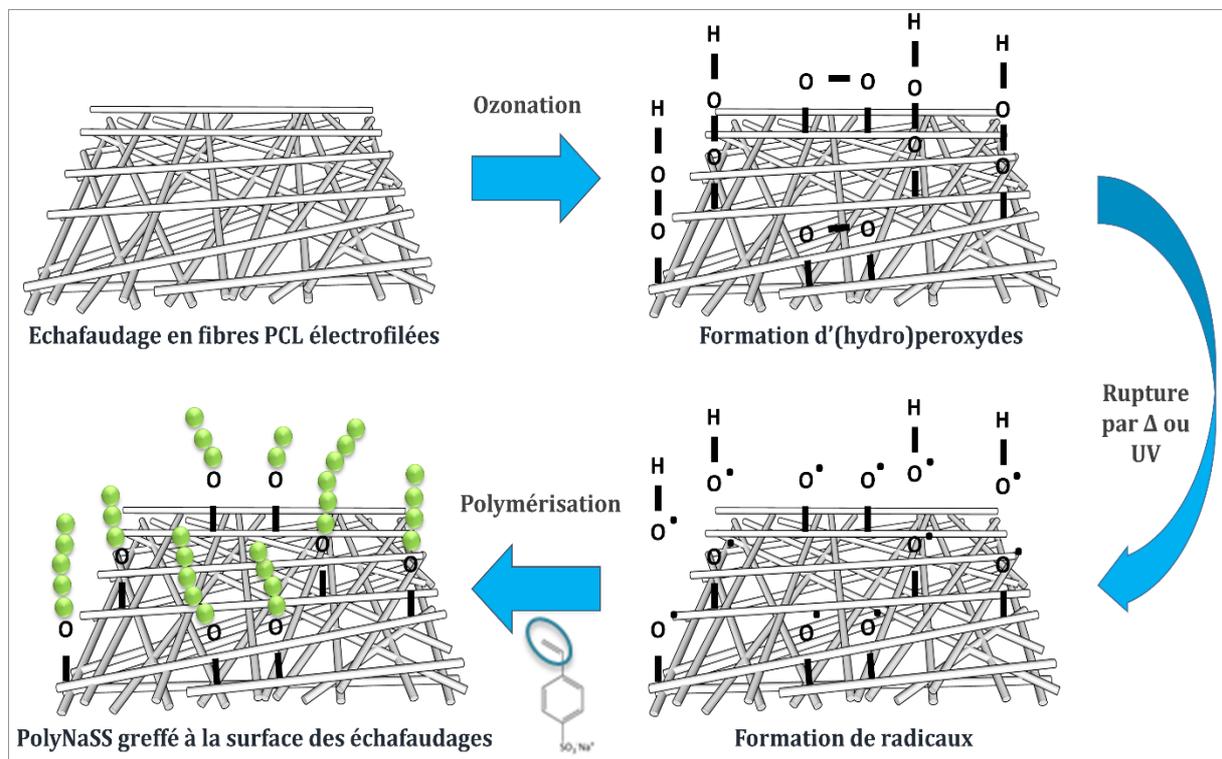


Figure 39 : Procédé de greffage du PolyNaSS à la surface d'échafaudage en fibre PCL électrofilées.

Les paramètres de greffage utilisés dans cette partie de l'étude sont résumés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Paramètres de la technique de « grafting from » ; greffage thermique et sous UV

	Greffage Thermique		Greffage UV avec activation	Greffage UV « direct »
Solution NaSS	0.7 M		0.7 M	
Activation de la surface	Ozonation 20 min		Ozonation 20 min	---
Source de radicaux	Chaleur à 45 °C		Irradiation UV à 160 mW/cm ²	
Temps de polymérisation	1 h	3 h	1 h	

L'objectif de cette partie de l'étude était donc de démontrer la faisabilité de cette technique de greffage sous irradiations UV pour fonctionnaliser des surfaces avec une architecture beaucoup plus complexe que des films PCL avec une surface plate, et ainsi vérifier ces conditions optimales de greffage préalablement déterminées.

Etant donné le caractère poreux de ces échafaudages et la disponibilité d'une plus grande surface, nous nous attendons à une plus grande réactivité, et de ce fait, une plus grande efficacité du greffage.

4.2.1 Caractérisation du greffage sur membranes en fibres PCL électrofilées:

A la fin du processus de greffage sur les 2 différents échafaudages en fibres PCL électrofilées (issus des membranes μm et nm), et après des rinçages de 48 h dans de l'eau distillée, nous avons commencé par comparer les taux de greffage obtenus sur ces échafaudages, pour confirmer ou infirmer d'éventuelles différences en termes de taux de greffage.

Nous avons déterminé la quantité de polyNaSS greffée sur la surface des différents échantillons (pour les deux types d'échafaudages) en utilisant la méthode colorimétrique au BT (Fig. 40).

Nous avons constaté que, comme pour le greffage sur films PCL [310], le taux de greffage polyNaSS sur les échafaudage en fibre PCL a atteint une valeur maximale (1.06 ± 0.15) $\times 10^{-4}$ mol.g⁻¹ pour le greffage sous irradiation UV 1 h avec une ozonation de 20 min

(greffé UV 1 h - Oz 20 min). Les taux de greffage pour les deux greffages thermiques avec ozonation 20 min étaient de $(2.14 \pm 0.29) \times 10^{-5} \text{ mol.g}^{-1}$ et $(9.49 \pm 0.18) \times 10^{-5} \text{ mol.g}^{-1}$, après respectivement 1 h et 3 h de polymérisation à 45 °C. Le taux de greffage pour le greffage direct sous irradiations UV (sans activation de surface) était de $(4.37 \pm 0.14) \times 10^{-5} \text{ mol.g}^{-1}$. Comme espéré, le greffage sur ces échafaudages en fibres PCL électrofilées présente une plus grande efficacité que dans le cas des films PCL.

Comme pour les échantillons greffés, nous avons également dosé les groupements sulfonates sur des échafaudages en fibre PCL non greffés. Ils présentent un taux de « greffage » de $(1.56 \pm 0.34) \times 10^{-6} \text{ mol.g}^{-1}$, ce qui signifie, qu'il y a plus qu'un log de différence par rapport au taux de greffage le plus bas observé sur les échafaudages greffés (taux de greffage optimal obtenu sur des films PCL $(5.67 \pm 0.17) \times 10^{-5} \text{ mol.g}^{-1}$ contre $(1.06 \pm 0.15) \times 10^{-4} \text{ mol.g}^{-1}$ obtenu sur échafaudages en fibres PCL).

Ces résultats du greffage, par dosage au BT, ne permettent pas de mettre en évidence des différences significatives de taux de greffage entre les 2 types d'échafaudages, même s'il existe de légères variations.

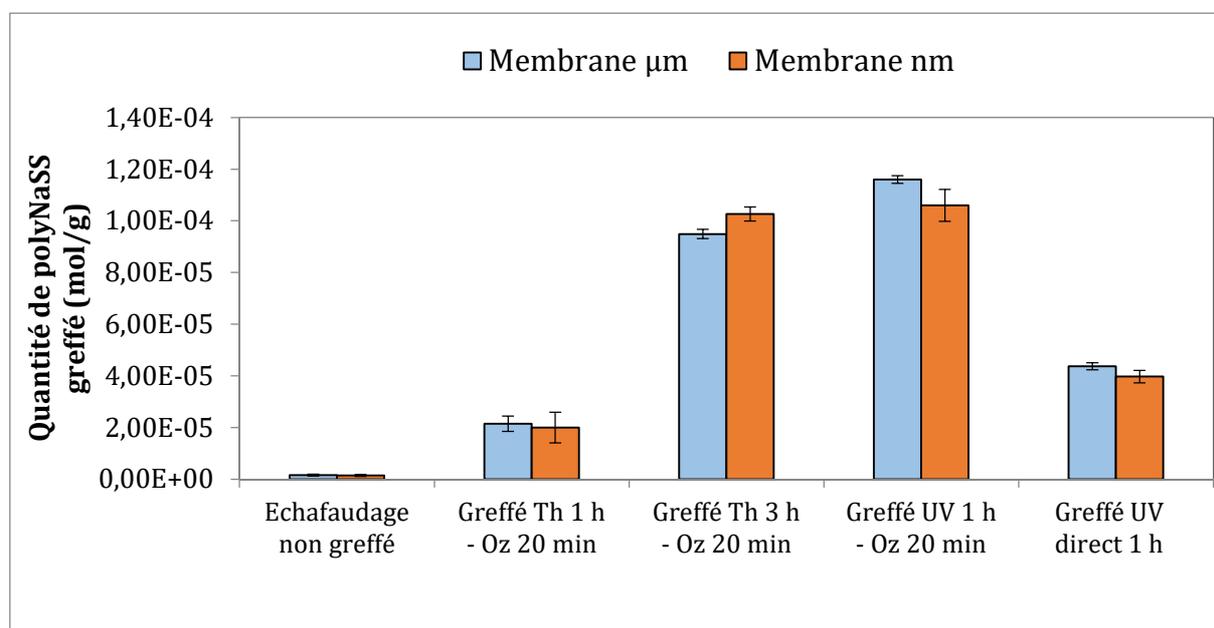


Figure 40 : Taux de greffage de polyNaSS sur les 2 types d'échafaudages en fibres PCL électrofilées.

Nous avons aussi réalisées des mesures d'angle de contact. Le polyNaSS qui est connu pour être un polymère ionique et hydrophile, lorsqu'il est greffé sur une surface PCL

devrait entraîner une diminution de l'angle de contact par rapport à une surface PCL non greffée. Les résultats obtenus pour les 2 échafaudages sont présentés dans la Figure 41.

Nous pouvons observer, à partir de la Figure 41, que la présence de polyNaSS greffé sur la surface des échafaudages en fibre PCL entraîne des angles de contact inférieurs à ceux des échafaudages en fibre PCL non greffés.

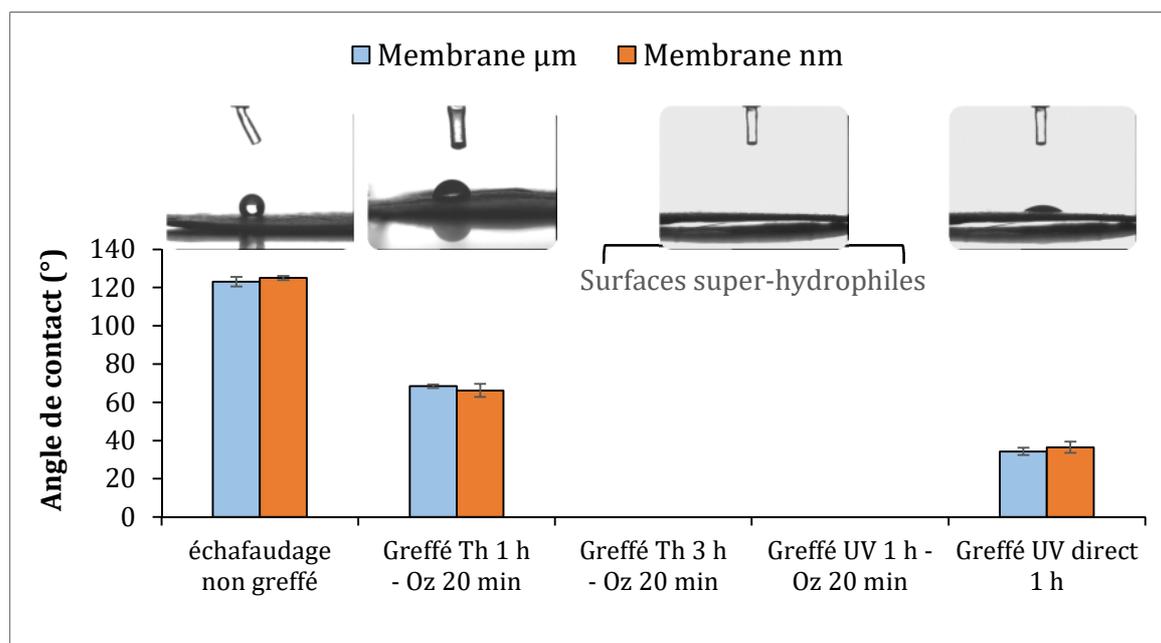


Figure 41 : Angles de contact et images de gouttes d'eau sur des échafaudages en fibres PCL électrofilées greffés et non greffés.

Les échantillons non greffés ont donné un angle de contact $\approx 123 \pm 2.5^\circ$. Le greffage thermique 1 h - Oz 20 min donne un angle de contact $\approx 70 \pm 0.9^\circ$ et le greffage directe UV 1 h donne un angle de contact $\approx 35 \pm 1.9^\circ$. Pour le greffage thermique 3 h - Oz 20 min et le greffage UV 1 h - Oz 20 min, les angles de contact étaient de 0° (impossibilité de prendre une image de la goutte d'eau sur ces surfaces greffées, puisqu'elle s'étale complètement au bout de 5 secondes), ce qui signifie que ces deux techniques ont donné des surfaces super hydrophiles.

Des quantités plus élevées de polyNaSS greffé combinées à des valeurs d'angle de contact significativement plus faible (0°) observée pour le greffage thermique 3 h et le greffage UV 1 h (tous deux avec activation de la surface par ozonation de 20 min) par rapport au greffage thermique 1 h - Oz 20 min et au greffage direct UV 1 h suggère un revêtement plus homogène et complet de la surface avec le polyNaSS greffé. Ceci est

probablement dû à la création, grâce à l'étape d'ozonation, d'une couche superficielle d'(hydro)peroxydes de PCL qui augmente le nombre de radicaux disponibles, ce qui initie plus efficacement la polymérisation du NaSS.

Les mesures d'angles de contact n'ont, elles aussi, pas permis de mettre en évidence des différences en taux de greffage entre ces deux échafaudages.

De plus, l'analyse chimique des éléments par EDX a montré la présence des atomes caractéristiques du PCL (C et O) sur les échafaudages en fibres PCL. Elle a également montré, sur les échantillons greffés polyNaSS, la présence d'atomes de Na et de S, composés essentiels du polyNaSS greffé (Tableau 8). Chaque condition de greffage, pour les deux types d'échafaudages, a été analysée en triplicata.

A partir du Tableau 8, nous pouvons observer que les valeurs de Na et S détectées sur les différents échantillons greffés sont plus élevées sur les échantillons greffés Th 3 h – Oz 20 min et UV 1 h – Oz 20 min, avec des valeurs assez proches, confirmant que, comme pour les résultats de dosage colorimétrique au BT, c'est ces deux techniques qui permettraient de greffer le plus de groupements sulfonates à la surface du PCL.

Tableau 8 : Pourcentages atomiques des éléments sur les différents échafaudages greffés polyNaSS et non greffés.

Echantillon	Type	Composition atomique (%)			
		C	O	Na	S
Non greffé	µm	79.88 ± 2.96	20.11 ± 2.23	/	/
	nm	79.95 ± 1.47	20.04 ± 2.55	/	/
G Th 1 h - Oz 20 min	µm	79.91 ± 2.63	20.0 ± 2.66	0.04 ± 0.03	0.03 ± 0.01
	nm	83.66 ± 2.37	16.24 ± 2.36	0.04 ± 0.04	0.02 ± 0.03
G Th 3 h - Oz 20 min	µm	74.39 ± 3.34	23.96 ± 3.90	0.59 ± 0.15	1.05 ± 0.47
	nm	73.67 ± 3.52	24.72 ± 3.90	0.73 ± 0.19	0.87 ± 0.23
G UV 1 h - Oz 20 min	µm	80.04 ± 4.88	18.32 ± 3.76	0.50 ± 0.25	1.11 ± 0.17
	nm	82.61 ± 1.99	15.87 ± 1.72	0.36 ± 0.03	1.15 ± 0.15
G UV direct 1 h	µm	79.07 ± 4.53	20.54 ± 4.7	0.16 ± 0.04	0.21 ± 0.08
	nm	82.07 ± 2.02	17.61 ± 1.89	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.01

Le greffage UV direct 1 h, quant à lui, présente des valeurs, certes inférieures à celles observées pour ces deux premières techniques, mais bien supérieures à un greffage en utilisant une source thermique pendant le même temps de polymérisation.

Pour les échantillons greffés Th 3 h – Oz 20 min, des valeurs de C très basses et de O élevées, par rapport aux autres échantillons greffés, pour les deux types d'échafaudages suggèrent, dans le cas de ces analyses XPS, que le rendement de greffage est le plus élevé, même si les valeurs de Na et S sur ces échantillons ne permettent pas de confirmer ces tendances. Au vu des écarts types enregistrés, qui peuvent être parfois assez importants, l'analyse élémentaire ne permet pas d'observer de réelles tendances entre ces deux types d'échafaudages.

Une cartographie élémentaire a été réalisée à l'aide du système EDX sur les échafaudages en fibres PCL greffés, afin d'observer la distribution des éléments à la surface des échantillons greffés et de confirmer l'homogénéité du revêtement polyNaSS sur les fibres PCL. La Figure 42 présente la cartographie des deux échafaudages non greffés et ceux greffés sous irradiations UV (avec et sans ozonation). A noter que, la même cartographie a été réalisée sur les échantillons greffés par voie thermique avec ozonation 20 min (Th 3 h et Th 1h).

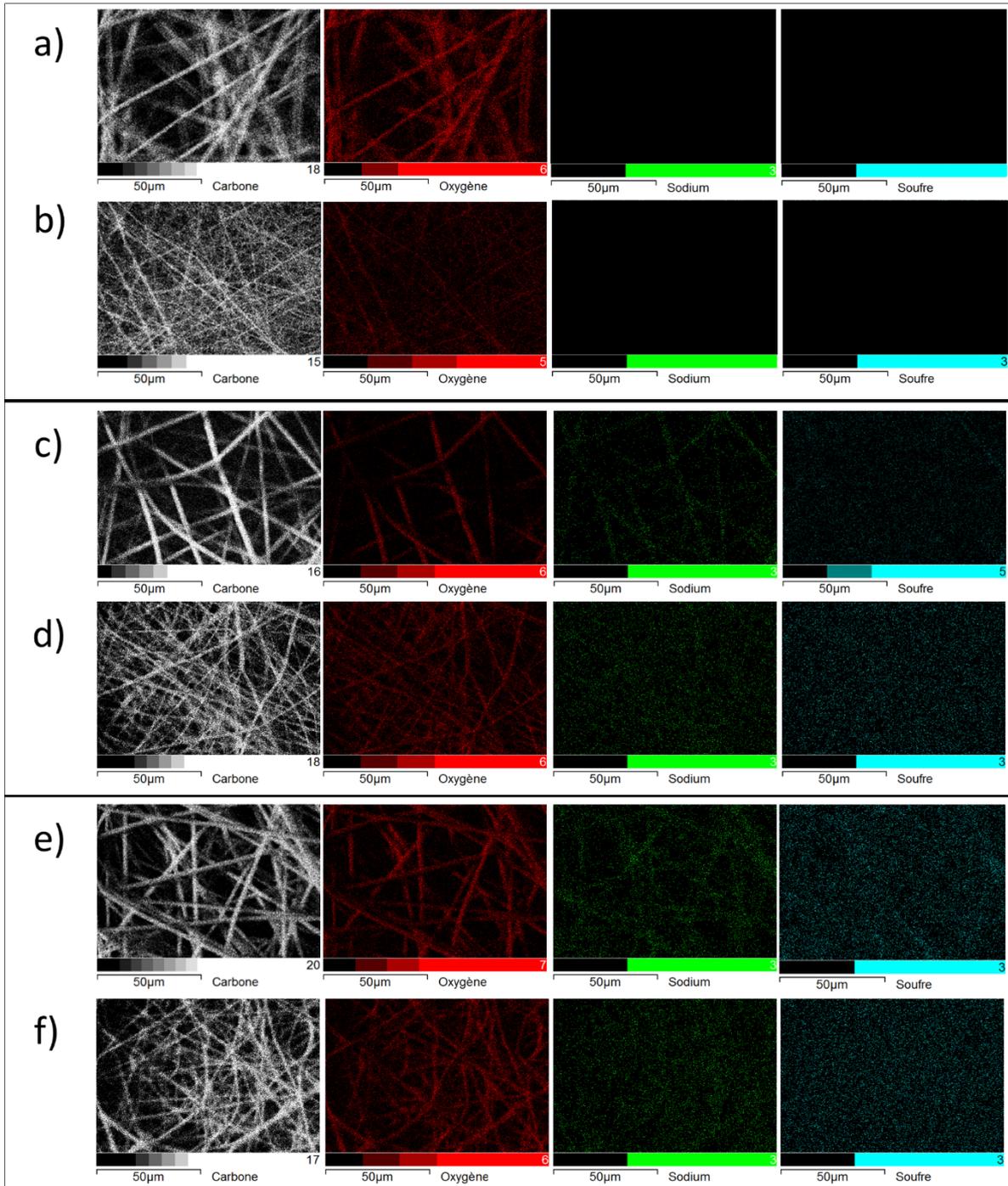


Figure 42 : Mapping/distribution des éléments sur : échafaudages non greffés [a) μm et b) nm], échantillons greffés UV 1 h – Oz 20 min [c) μm et d) nm], échantillons greffés UV direct 1 h [e) μm et f) nm].

Ce mapping des surfaces permet d'observer l'homogénéité du greffage polyNaSS sous irradiations UV, que ce soit avec ou sans ozonation.

La détection des éléments C et O avec le système EDX permet de révéler la morphologie en 3D des échafaudages « μm », grâce à des diamètres de fibres $> 1 \mu\text{m}$ et des pores assez

larges. Sur les échafaudages issus des membranes « nm », il est difficile de distinguer cette structure à cause des fibres nanométriques formant des pores très étroits. Par ailleurs, nous pouvons observer qu'il n'y a que sur les échafaudages « μm », que nous avons un dessin des fibres constituant l'échafaudage par le Na.

La caractérisation du greffage de polyNaSS, par dosage au BT, angle de contact et EDX, à la surface de ces deux échafaudages greffés, n'ont pas permis de conclure à l'existence de différences en ce qui concerne l'efficacité du greffage sur ces échafaudages en fonction du diamètre des fibres ou l'architecture de la surface. Nous partons donc du principe, étant donné la limite de sensibilité de ces techniques, que l'efficacité du greffage de ce polymère bioactif n'est pas fonction de la morphologie des membranes ou échafaudages, mais uniquement des conditions de greffage et des techniques employées.

Les spectres FTIR ont montré sur les échafaudages en fibre PCL greffés la présence de pics spécifiques du polyNaSS sur les surfaces des échantillons, quel que soit le type d'échafaudage. Les spectres de la Figure 43 montrent le spectre des échafaudages « μm » en fibres PCL non greffés, et des 4 échafaudages greffés avec le polyNaSS (Greffage thermique 1 h - Oz 20 min, greffage thermique 3 h - Oz 20 min, greffage UV 1 h - Oz 20 min et greffage UV directe 1 h) entre 700 et 3000 cm^{-1} .

Le cycle aromatique et les vibrations symétriques des groupes SO_3^- ont généré un doublet NaSS ($\text{O}=\text{S}=\text{O}$) situé à 1010 cm^{-1} (Tableau 9). L'absorption des sulfonates a été détectée par le pic à 1130 cm^{-1} qui est également associé à des vibrations asymétriques (Tableau 9). Enfin, la série de pics faibles entre 1498 et 1658 cm^{-1} sont attribuées aux vibrations d'étirement des liaisons ($\text{C}=\text{C}$) du cycle benzène (Tableau 9).

Tableau 9 : Bandes d'adsorption caractéristiques du polyNaSS

Longueur d'onde (cm^{-1})	Intensité des pics	Groupements chimiques et & interactions
1658-1598	Weak	$\nu(\text{C}=\text{C})$ du cycle aromatique
1411	Medium	$\nu(\text{SO}_2)$
1184-1130	High	SO_3^- (Sel)
1040	High	$\nu(\text{O}=\text{S}=\text{O})$
1010	High	Cycle aromatique

Comme attendu, l'intensité des pics est plus prononcée sur les échantillons avec une quantité élevée de polyNaSS greffée. De plus, en comparant les analyses FTIR des échafaudages en fibre PCL greffés polyNaSS aux spectres FTIR des films PCL greffés polyNaSS, réalisés dans la partie « développement du greffage sur surface PCL » [310], nous avons observé que le greffage sur des échafaudages en fibre PCL électrofilées permet d'identifier plus de pics caractéristiques du polyNaSS que dans le cas du greffage sur film PCL, et cela peut s'expliquer par la différence d'architecture des deux surfaces puisque la surface disponible sur ces échafaudages est supérieure à une surface plane.

Cependant, étant donné que le PCL est un composé organique, il est difficile de localiser les autres pics du polyNaSS parmi tous ceux du PCL. L'absence de pics spécifiques de polyNaSS a été vérifiée sur les échantillons non greffés.

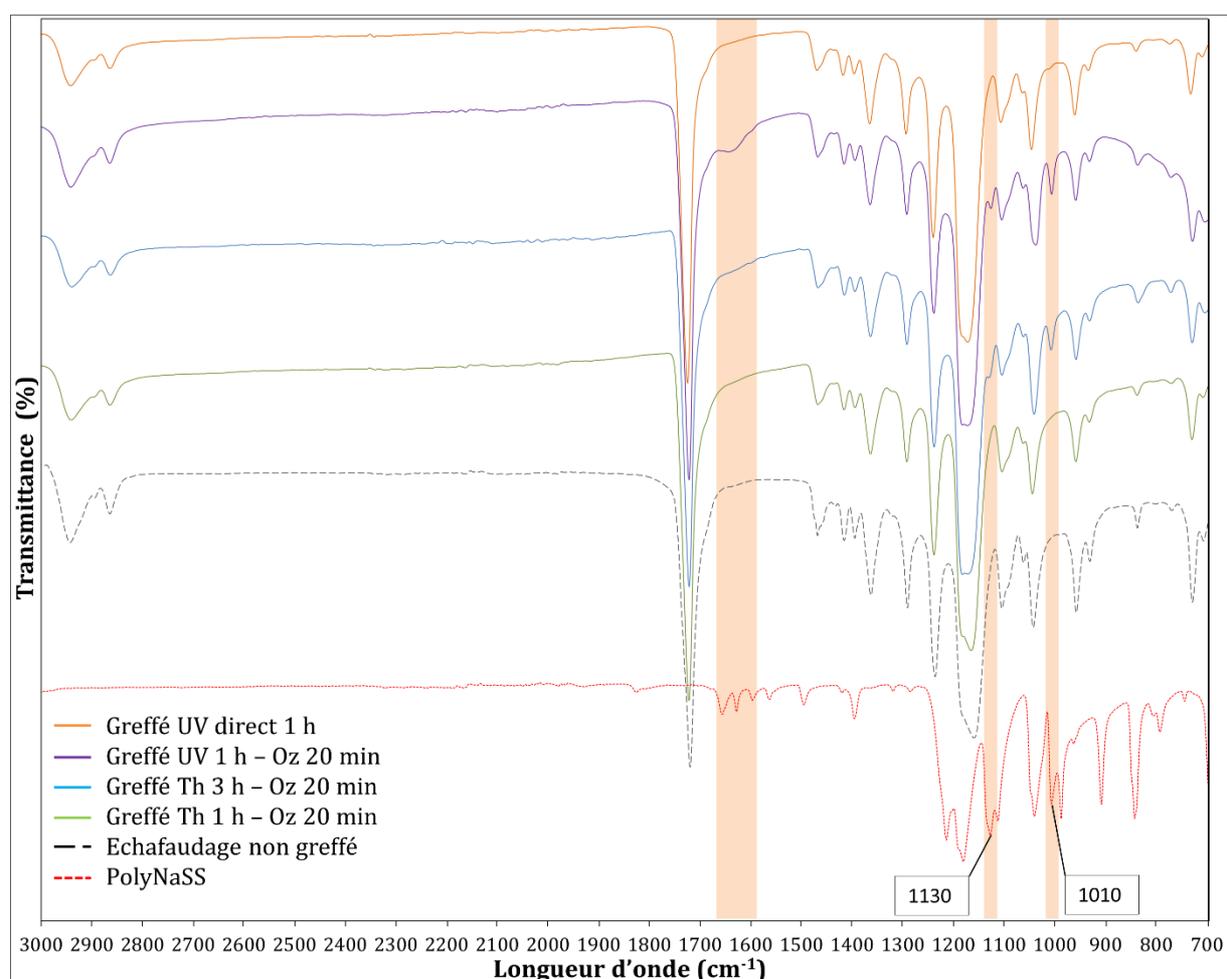


Figure 43 : Spectres FTIR-ATR des surfaces des échafaudages « µm » en fibres PCL électrofilées non greffé et greffés polyNaSS : de haut en bas ; (orange) greffé UV direct 1 h, (violet) greffé UV 1 h - Oz 20 min, (bleu) greffé Th 3 h - Oz 20 min, (vert) greffé Th 1 h - Oz 20 min, (noir) non greffé, (rouge) polyNaSS.

Par la suite, en collaboration avec le Dr. Vincent Humblot, des analyses XPS ont été réalisées sur les échafaudages « μm » en fibre PCL électrofilées, suivant les différents traitements et les différentes conditions de greffage du polyNaSS.

Nous avons choisi d'effectuer les analyses XPS sur ce type d'échafaudage (issu de la membrane μm), à cause de la facilité de production de cette membrane et la très grande reproductibilité de ces caractéristiques.

Nous voulions voir l'influence du processus de greffage (par voie UV et voie thermique), ainsi que l'influence de l'ozonation sur l'efficacité/rendement du greffage de polyNaSS sur ces échafaudages. Nous avons aussi vérifié l'impact du matériau de la seringue ; verre ou plastique, mais aussi l'influence de l'utilisation du papier aluminium comme support pour collecter les fibres électrofilées, sur la chimie de surface de ces membranes en fibres PCL électrofilées.

Pour rappel en Fig. 44, la structure supposée des membranes en fibres PCL non greffée et membranes en fibres PCL greffée avec polyNaSS. Chaque condition est réalisée en triplicata.

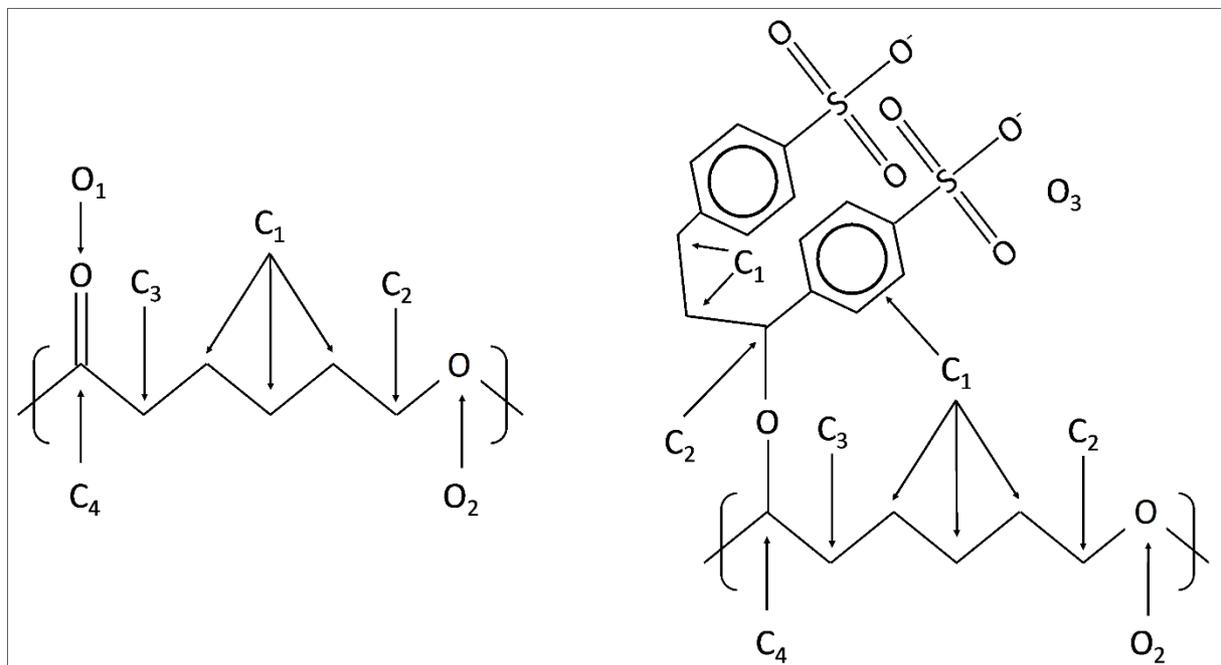


Figure 44 : Formule brute du PCL (gauche) et échafaudages en fibres PCL-polyNaSS (droite) avec les différents atomes de carbone et d'oxygène attribués en XPS.

Première série d'échantillons analysés : de face et de dos

Des échafaudages PCL non traités, produits en utilisant :

- ✓ Une seringue en verre (x 3)
- ✓ Une seringue en plastique (x 3)

Pour commencer, sur les spectres généraux, Figure 45, nous pouvons noter la présence attendue d'oxygène et de carbone avec des pics à 531 eV et 285 eV, que ce soit pour les échantillons analysés de face ou de dos, produit avec des seringues en plastique (droit) ou en verre (gauche). Nous pouvons également observer l'absence d'un signal qui serait dû à la présence d'aluminium sur ces échantillons, avec l'absence de pic à 73 eV (Al2p) ou à 118 eV (Al2s).

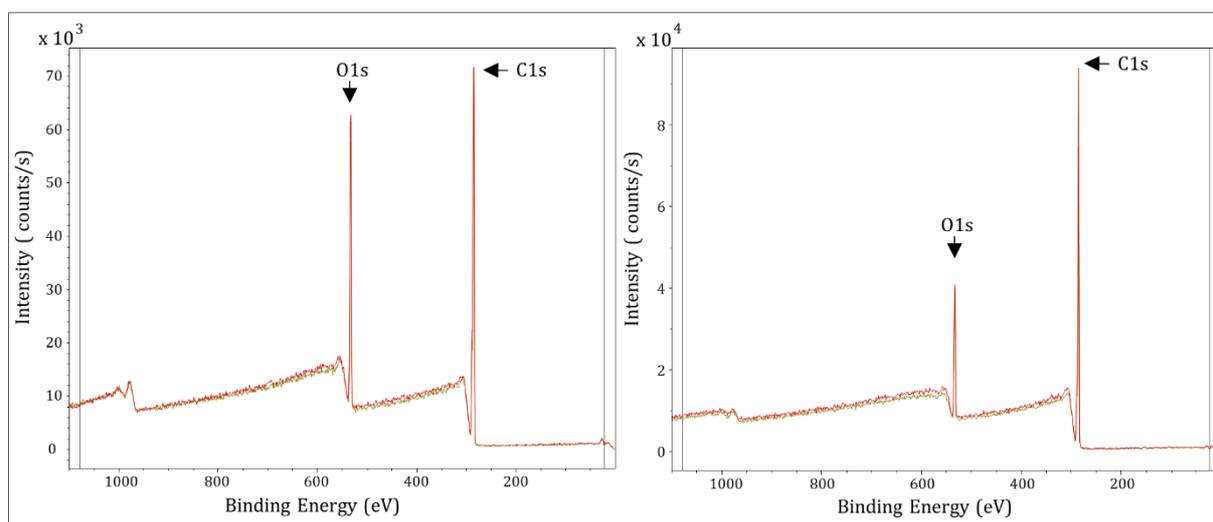


Figure 45 : Spectres généraux des échantillons d'échafaudages en fibres PCL non greffées, à gauche verre face + dos ; à droite plastique face + dos.

Cependant, nous avons noté une présence plus marquée de carbone sur les spectres de la colonne de droite, qui correspond aux échafaudages issus de la membrane produite en utilisant une seringue en plastique.

Cela est confirmé par les analyses élémentaires avec les pourcentages atomiques présentés en Tableau 10.

Tableau 10 : Pourcentages atomiques pour les échantillons non greffés réalisés à partir d'une seringue en verre ou en plastique, analysés de face et de dos.

Seringue	Numéro éch	Face		Dos	
		C1s	O1s	C1s	O1s
Verre	1	79.3	20.7	79.4	20.6
	2	71.1	27.9	79.0	21.0
	3	79.7	20.3	79.3	20.7
	4	89.4	10.6	88.7	11.3
Plastique	5	89.0	11.0	89.5	10.5
	6	90.1	9.9	89.8	10.2
PCL-Théorie		75.0	25.0	75.0	25.0

Ces valeurs sont très proches de celles obtenues lors d'analyses préliminaires, et confirme de ce fait, la présence d'impureté carbonée, en montrant néanmoins, la présence du PCL notamment grâce au spectre de l'oxygène qui est conforme à la composition du PCL (contribution aliphatique du C1s à basse BE, 285 eV, Fig. 46 et Tableau 11)

Par ailleurs, nous avons également observé une très bonne reproductibilité (homogénéité de la membrane) à travers les triplicatas très proche en compositions les uns des autres, de face comme de dos (si l'on ne tient pas compte de l'échantillon numéro 2 face).

De fait, nous avons réalisé l'analyse haute résolution des spectres C1s et O1s pour un seul set d'échantillon par seringue, à savoir l'échantillon numéro 1 (face et dos, seringue verre) et numéro 4 (face et dos, seringue plastique) (Fig. 46).

Ces résultats confirment la bonne composition chimique des échantillons préparés à partir d'une seringue en verre. Concernant les échantillons préparés à partir de la seringue en plastique, nous pouvons bien voir une composition carbonée excessive, matérialisée par un excès des contributions à basses énergies de liaison (285.0 et 285.5 eV). Nous estimons cette contamination à environ 40-45 % en nous basant sur une répartition C1/C2/C3/C4 théorique de 3/1/1/1 et sur un rapport C/O de 8 au lieu de 3, tandis qu'elle est uniquement d'environ 10% pour les échantillons préparés à partir de la seringue en verre, avec un rapport expérimental de 3.8 contre 3 en théorie (tableau 11).

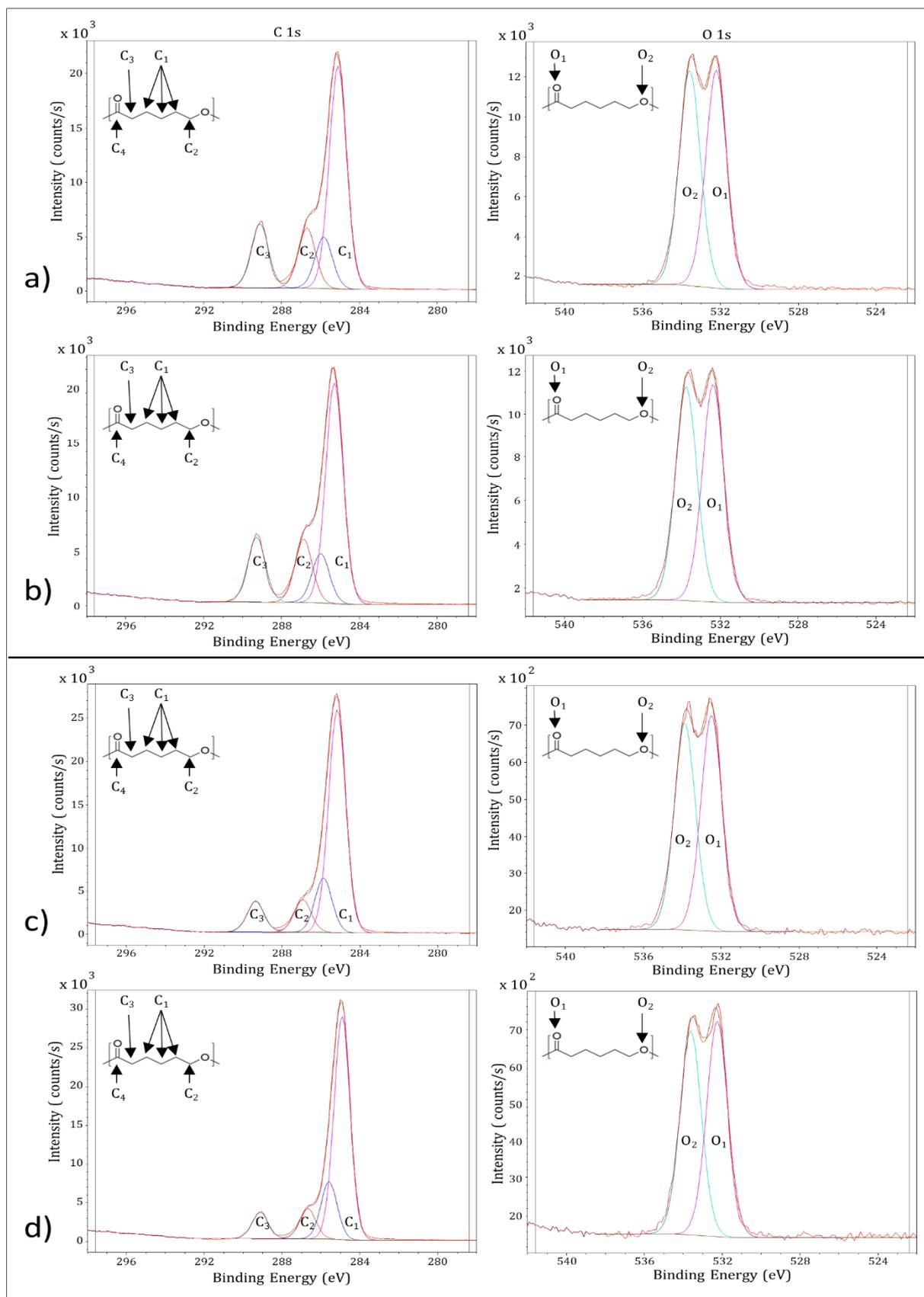


Figure 46 : Spectres XPS haute résolution des régions C1s (à gauche) et O1s (à droite) pour les échantillons suivants (de haut en bas) : a) éch 1 face, b) éch 1 dos, c) éch 4 face et d) éch 4 dos.

Néanmoins, au regard des spectres O1s, nous voyons une bonne répartition des 2 contributions O1 et O2, montrant que malgré l'excès de carbone, le PCL est bien présent est qu'il est sans doute chimiquement proche de la stœchiométrie théorique.

Tableau 11 : Pourcentages atomiques élément par élément, contribution par contribution et contribution totale, pour les échantillons ; n° 1 (seringue verre, face et dos) et n° 4 (seringue plastique, face et dos).

		% Atomique						C / O
		C1s				O1s		
		C1	C2	C3	C4	O1	O2	
BE (eV)		284.9	285.5	286.2	289.4	532.5	533.7	
Seringue Verre Ech n° 1	Face	79.3				20.7		3.8
		55.9	12.9	15.1	16.1	50.35	49.65	
Seringue Verre Ech n° 1	Dos	79.4				20.6		3.8
		55.5	12.4	15.8	16.3	50.35	49.65	
Seringue Plastique Ech n° 4	Face	89.4				10.6		8.4
		66.0	17.1	9.0	7.9	51.4	48.6	
Seringue Plastique Ech n° 4	Dos	88.7				11.3		7.8
		65.5	16.0	9.5	9.0	51.0	49.0	
PCL Th.		75.0				25.0		3
		50.0	16.6	16.6	16.6	50.0	50.0	

Deuxième série d'échantillons analysés : produits avec une seringue en verre

- ✓ Echantillons ozonés 20 min (numéro éch ; 7 à 9)

Suite à l'ozonation, nous n'observons pas de grosses variations quant à la quantité d'oxygène présent à la surface des échantillons, Tableau 12. Cependant, si l'ozonation « active » le C=O du PCL, il n'est pas censé qu'il y ait une variation de la composition chimique.

Tableau 12 : Pourcentages atomiques pour les échantillons non greffées ozonées (20 min) réalisés à partir d'une seringue en verre.

Numéro éch	% Atomique		
	C1s	O1s	C1s/O1s
1 (référence)	79.4	20.6	3.8
7	78.0	22.0	3.5
8	79.1	20.9	3.8
9	77.7	22.3	3.5
PCL-Th.	75.0	25.0	3

En revanche, le changement d'environnement chimique des atomes d'oxygène suite à l'ozonation est bien visible sur les différentes contributions du PCL, Tableau 13, avec une augmentation de la contribution à plus basse BE.

Tableau 13 : Pourcentages atomiques élément par élément, contribution par contribution et contribution totale, pour les échantillons non greffés ozonés 20 min, réalisés à partir d'une seringue en verre.

		% Atomique						C / O
		C1s				O1s		
BE (eV)		C1	C2	C3	C4	O1	O2	
Seringue Verre n° éch	7	59.6	14.3	10.8	15.3	55.8	44.2	3.5
	8	58.2	16.0	10.4	15.4	53.7	46.3	3.8
	9	60.8	13.8	10.0	15.4	57.3	42.8	3.5
PCL Th.		50.0	50.0	50.0	16.6	51.0	49.0	3

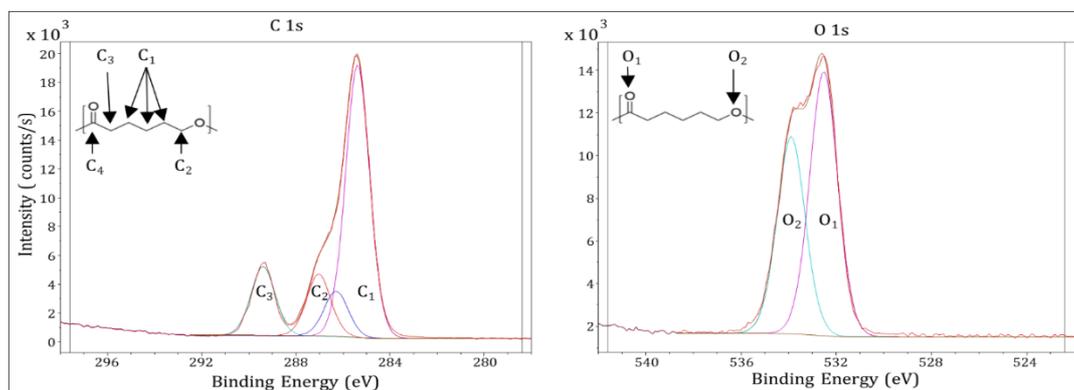


Figure 47 : Spectres XPS haute résolution des régions C1s (à gauche) et O1s (à droite) pour l'échantillon ozoné n° 8.

Une fois que nous avons fini d'analyser ces échantillons témoins, nous avons réalisé des analyses poussées sur les échantillons greffés polyNaSS avec les différentes conditions de greffage.

Les analyses qui suivent (séries d'échantillons 3 à 6) (Tableau 14) concernent les échantillons greffés polyNaSS en utilisant les différentes conditions de greffage. Les analyses ci-dessous n'ont été, encore une fois, effectuées que pour les échantillons issus à partir de seringues en verre, même si les analyses XPS ont également été effectuées sur les échantillons issus des seringues en plastique.

Tableau 14 : Numéro/série et conditions de greffage des différents échantillons analysés

Série	Condition de greffage	Numéro éch
3	Greffé Th 1 h - Oz 20 min	13 à 15
4	Greffé Th 3 h - Oz 20 min	19 à 21
5	Greffé UV 1 h - Oz 20 min	25 à 27
6	Greffé UV direct 1 h	31 à 33

Ci-dessous, sont présentés, les résultats pour les triplicatas de chacune des séries. Les résultats sont relativement reproductibles d'un échantillon à un autre, à part un petit écart pour la série 4 avec l'échantillon n° 21, mais dans l'ensemble, les résultats restent homogènes.

Sur les spectres « survey » généraux (Fig. 48), nous avons l'apparition du signal du Soufre et les différents pourcentages atomiques sont reportés dans le Tableau 15. Nous avons observé une grande variabilité dans les pourcentages (%) atomiques de S2p en fonction des séries, ainsi que dans les différents rapports C/S et O/S, comme attendus suite aux dosages colorimétriques au BT.

Tableau 15 : Pourcentages atomiques pour les échantillons, réalisés à partir d'une seringue en verre, greffées avec du polyNaSS suivants les différentes conditions. *Sur la base de 2 motifs polyNaSS par PCL.

	N° éch	% Atomique					
		C1s	O1s	S2p	Na1s	C/S	O/S
G Th 1 h - Oz 20 min	13	77.8	20.8	1.0	0.4	77.8	20.8
	14	77.7	21.0	0.9	0.4	86.3	23.3
	15	77.5	20.8	1.2	0.5	64.6	17.3
G Th 3 h - Oz 20 min	19	77.6	20.6	1.3	0.5	59.7	15.8
	20	76.6	21.5	1.4	0.5	54.7	15.3
	21	78.3	20.7	0.75	0.25	104.4	27.6
G UV 1 h - Oz 20 min	25	76.4	20.2	2.8	0.6	27.3	7.2
	26	74.6	21.8	2.8	0.8	26.6	7.8
	27	74.8	20.8	3.3	1.1	22.7	6.3
G UV direct 1 h	31	79.35	20.35	0.3	ND	264.5	60.8
	32	79.15	20.2	0.5	0.1	158.3	40.4
	33	80.1	19.2	0.5	0.2	160.2	38.4
	PCL-PolyNaSS Th*	67.7	25.8	3.2	3.2	21.15	8.05

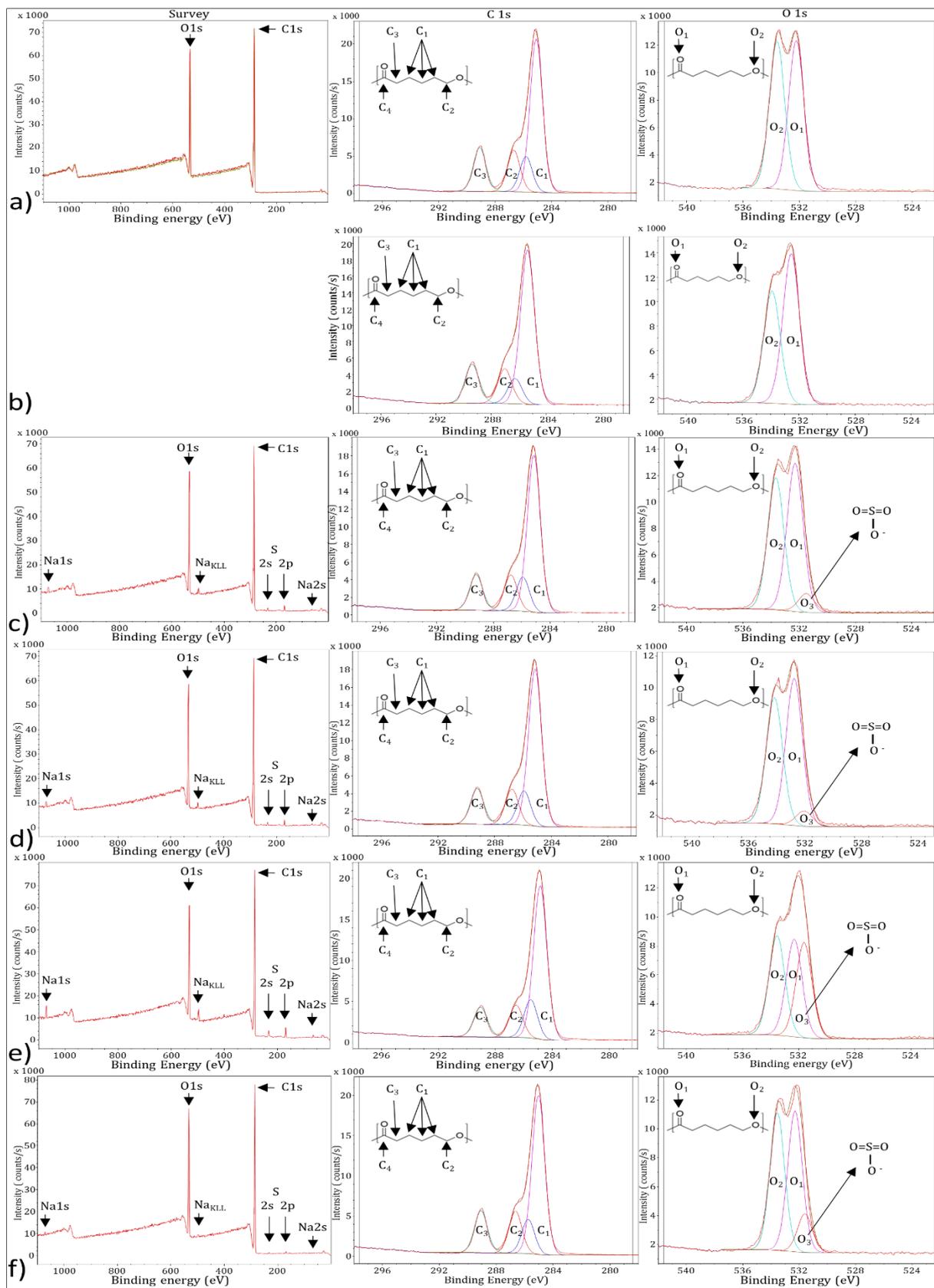


Figure 48 : Spectres généraux « survey » (gauche), spectres XPS haute résolution des régions C1s (milieu) et O1s (droite), de haut en bas ; a) éch 1 (non greffé), b) éch 8 (Oz 20 min), c) éch 15 (G Th 1 h - Oz 20 min), d) éch 20 (G Th 3 h - Oz 20 min), e) éch 27 (G UV 1 h - Oz 20 min) et f) éch 32 (G UV direct 1 h).

Pour les analyses plus détaillées sur chacune des séries 3 à 6, nous avons choisi de nous concentrer sur l'échantillon donnant le meilleur taux de soufre, à savoir les échantillons numéro ; 15 (G Th 1 h – Oz 20 min), 20 (G Th 3 h – Oz 20 min), 27 (G UV 1 h – Oz 20 min) et 32 (G UV direct 1 h).

Sur les spectres généraux (Fig. 48. gauche), nous avons noté sur la Fig. 48. a, représentant l'échafaudage en fibres PCL non traité, la présence attendue d'oxygène et de carbone avec des pics centrés à 531 eV et 285 eV, respectivement. Il y a une légère différence entre les pourcentages atomiques théoriques et les pourcentages observés, avec plus de carbone que prévu, probablement en raison d'une contamination au carbone due aux analyses XPS. Lorsqu'on examine les spectres XPS à haute résolution pour les régions C1 et O1s, les données brutes peuvent être décomposées en 4 contributions et 2 contributions, respectivement.

En ce qui concerne la région C1s, les 4 contributions sont attribuées, comme indiqué à la Figure 44, en fonction des différents environnements chimiques des atomes de carbone. Les analyses quantitatives montrent une bonne concordance entre la distribution théorique et la distribution expérimentale (Tableau 16), avec seulement une faible surexpression du C1 à faible énergie de liaison (BE), encore une fois due à la contamination par le carbone. La région O1s montre 2 contributions assignées aux deux formes chimiques des atomes d'oxygène présents dans le PCL, avec une très bonne concordance pour les pourcentages atomiques observés par rapport à ceux attendus (Fig. 45 et Tableau 16).

Après le processus de greffage du polyNaSS suivant différentes conditions, chaque spectre général montre la présence supplémentaire de Na1s à 1071 eV (accompagnée de son pic Auger correspondant à 497 eV) et S2p à 168 eV (avec le pic S2s à environ 230 eV), ce qui confirme un greffage réussi du polyNaSS sur ces échafaudages en fibres PCL. Le greffage est également confirmé en observant les spectres XPS haute résolution de la région O1s, (Fig. 48. c. d. e. f.), avec l'apparition d'une contribution en épaulement à faible énergie de liaison, 531,6 eV, affectée aux atomes d'oxygène O3 (Fig. 44).

Le Tableau 16 énumère les différents pourcentages atomiques de région et de contribution pour ces quatre échantillons greffés polyNaSS. Les taux de soufre sont faibles et éloignés des rapports théoriques attendus.

Tableau 16 : Pourcentages atomiques élément par élément, contributions et contribution totale pour les différents échafaudages en fibres PCL ; non greffés et greffés polyNaSS. * sur la base de 2 motifs polyNaSS par unité PCL.

% Atomique	C1s				O1s			Na1s	S2p		C/O	C/S	C/O ₃	O ₃ /S
	C1	C2	C3	C4	O3	O1	O2							
BE (eV)	284.9	285.5	286.2	289.4	531.6	532.5	533.7	1071.5	169.2	168.1				
Non greffé	79.3				20.7			--	--		3.8	--	--	--
	55.9	12.9	15.1	16.1	--	50.35	49.65							
	44.4	10.3	12.0	12.8	--	10.3	10.2							
G Th 1 h - Oz 20 min	77.5				20.8			0.5	1.2		3.7	64.6	59.8	1.1
	58.9	12.9	13.7	14.5	6.2	49.6	44.2							
	45.8	10.0	10.7	11.2	1.3	10.3	9.2							
G Th 3 h - Oz 20 min	76.6				21.5			0.5	1.4		3.6	54.7	70.1	0.8
	59.8	13.0	13.6	13.7	5.2	51.5	43.7							
	46.1	10.0	10.5	10.5	1.1	10.6	9.1							
G UV 1 h - Oz 20 min	74.8				20.8			1.1	3.3		3.6	22.7	10.5	2.2
	60.4	12.7	15.1	11.8	32.6	33.3	34.1							
	45.4	11.3	9.5	8.9	7.1	6.8	6.9							
G UV direct 1 h	79.2				20.2			0.2	0.6		3.9	132.0	31.2	4.2
	57.25	12.3	15.2	15.25	12.3	44.3	43.4							
	44.2	9.7	12.0	12.0	2.5	9.0	8.8							
PCL - PolyNaSS Théorique*	67.7				25.8			3.2	3.2		2.6	21.15	3.5	6.1
	71.4	28.6			75.0	25.0								
	48.4	19.4			19.4	6.4								
PCL Théorique	75.0				25.0			--	--		3	--	--	--
	50.0	16.6	16.6	16.6	--	50.0	50.0							
	37.5	12.5	12.5	12.5	--	12.5	12.5							

De plus, d'un point de vue des différents environnements chimiques, Fig. 48 et Tableau 16, la présence de l'oxygène lié au groupement sulfonate est beaucoup moins marquée (composant à basse BE 531 eV), mais nous n'avons pas pu expliquer ces différences de profil de spectre.

Par ailleurs, nous avons observé une grande variabilité dans les pourcentages atomiques de S2p selon les différentes séries d'échantillons greffés, ainsi que sur les différents rapports C/S et O/S, comme prévu après les mesures de dosage colorimétriques au BT. Si nous comparons les résultats expérimentaux aux résultats théoriques, plusieurs différences peuvent être observées.

Tout d'abord, toutes les concentrations atomiques de Na sont très faibles, ce qui s'explique par les conditions de rinçage appliquées après les greffages (48 h avec eau distillée). Lorsqu'on regarde les pourcentages atomiques de S2p, ils sont la plupart du temps inférieurs aux valeurs attendues, sauf pour l'échantillon greffé UV 1 h - Oz 20 min qui correspond presque à la valeur théorique. Ceci est également observé pour la contribution des atomes d'oxygène O3 avec des pourcentages observés beaucoup plus faibles allant de 1 à 7 % par rapport à la valeur attendue de 19,2 (Tableau 16). Ces données suggèrent clairement que l'efficacité du greffage polyNaSS n'est pas totale et qu'elle est également fonction des conditions de greffage elles-mêmes.

En ce qui concerne l'efficacité du greffage de polyNaSS, il est clair que l'étape d'activation de la surface par traitement à l'ozone (pendant 20 min) est nécessaire pour optimiser le rendement du greffage de polyNaSS car, en l'absence de cette étape d'ozonation, le taux de greffage est minimal (échantillon greffé UV direct 1 h). Dans des conditions identiques (greffage thermique 1 h - Oz 20 min), le greffage sous irradiation UV est préférable au greffage thermique (greffage UV 1 h - Oz 20 min vs. greffage thermique 1 h - Oz 20 min, respectivement). Enfin, plus de polyNaSS est greffé après 3 heures comme temps de polymérisation en greffage thermique qu'après 1 heure (greffage thermique 3 h - Oz 20 min vs. greffage thermique 1 h - Oz 20 min, respectivement).

Enfin, les taux de greffage en fonction des différentes conditions ont été calculés afin de les comparer avec les mesures du dosage colorimétrique au BT. Pour ce faire, nous avons déterminé les taux de greffage en divisant les rapports théoriques impliquant du soufre par les rapports expérimentaux ; ces valeurs sont présentées dans le Tableau 17.

La Fig. 49, montre une comparaison entre les valeurs XPS obtenues et celles obtenues par les mesures colorimétriques au BT.

Tableau 17 : Taux de greffage de PolyNaSS sur les échafaudages en fibres PCL pour les différentes conditions de greffage, obtenus par dosage colorimétrique au TB et par calcul XPS.

Echantillons	Dosage colorimétrique au BT (mol/g)	% $(C/S)_{th}/(C/S)_{exp}$	% $(O/S)_{th}/(O/S)_{exp}$
Non greffé	1.56×10^{-6}	--	--
G Th 1 h - Oz 20 min	2.14×10^{-5}	32.7	46.5
G Th 3 h - Oz 20 min	9.49×10^{-5}	38.7	52.6
G UV 1 h - Oz 20 min	1.06×10^{-4}	93.2	127.8
G UV direct 1 h	4.37×10^{-5}	13.4	19.9

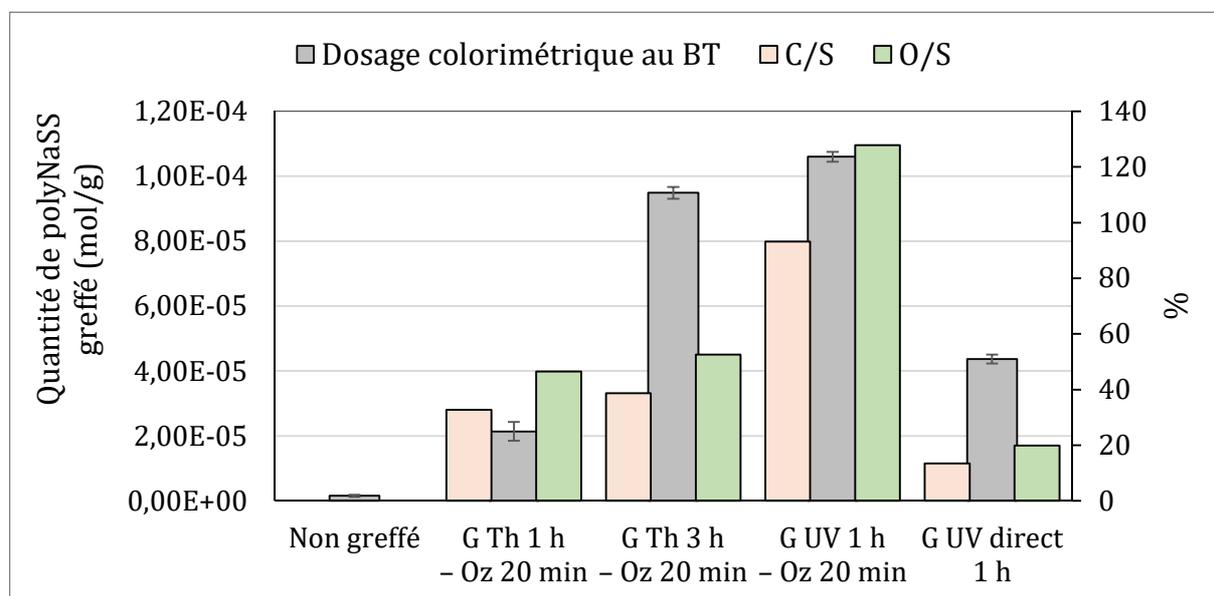


Figure 49 : Comparaison entre les valeurs XPS obtenues et celles obtenues par dosage colorimétrique au BT.

Il existe une tendance relativement similaire entre les valeurs XPS et les résultats du dosage colorimétrique au BT, à l'exception du greffage UV direct 1 h où les pourcentages XPS montrent un taux de greffage inférieur à celui du greffage Thermique 1 h - Oz 20 min, mais ceci peut être probablement dû à la morphologie poreuse des échafaudages où le polyNaSS est greffé sur les fibres en surface mais aussi sur les fibres situées en profondeur, rendant ces molécules greffées sur des plans profonds accessibles par mesure chimique au BT mais pas par analyses de XPS.

Les résultats des différentes caractérisations réalisées sur ces échantillons greffés, à savoir ; dosage colorimétrique au BT, angle de contact, MEB-EDX, FTIR-ATR et XPS ont démontré une réelle concordance des résultats, en retrouvant dans la majeure partie des cas une corrélation des résultats et la confirmation des tendances observées sur les différents échantillons greffés, d'une technique à une autre.

4.2.2 Etude de l'effet du processus de greffage sur les propriétés intrinsèques :

En utilisant la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et la chromatographie d'exclusion stérique (SEC), nous avons étudié les changements possibles des propriétés intrinsèques du polymère PCL (température de fusion (T_m) et degré de cristallinité (X_c) pour la DSC, et Masse molaire moyenne en nombre (M_n) et indice de polydispersité (\mathcal{D}) pour la SEC).

Nous avons reproduit les 4 différents procédés de greffage (à savoir ozonation, chauffage à 45 °C et irradiation sous UV) sans introduire le monomère NaSS pour simuler les étapes de greffage, afin d'étudier l'effet de ces étapes sur les propriétés intrinsèques du PCL indépendamment de la présence du greffage polyNaSS lui-même.

Le processus de greffage du polyNaSS, fait intervenir tout un ensemble de traitements nécessaires à ce dernier ; par exemple l'activation de la surface par ozonation pour pouvoir greffer par voie thermique ou pour optimiser le rendement du greffage dans le cas du greffage par voie UV (comme expliqué plus haut dans les résultats d'XPS). Il y a aussi les irradiations UV utilisées pour créer des radicaux libres à la surface du PCL que ce soit par décomposition d'(hydro)peroxydes de PCL (après ozonation) ou pour produire des radicaux libres directement à partir de la surface PCL. N'oublions pas aussi la chaleur à 45 °C, pendant 1 h ou 3 h, pour greffer par voie thermique, qui reste même si elle est un peu loin de la température de fusion du PCL, assez élevée.

Ces différents traitements physiques et/ou chimiques risquent d'induire des changements dans les propriétés intrinsèques de notre polymère utilisé pour la production des échafaudages, et de ce fait altérer la structure ou la stabilité de celui-ci.

Nous avons étudié les variations des propriétés du PCL comme suit ;

4.2.2.1 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC) :

La calorimétrie différentielle à balayage permet de mesurer la variation du flux de chaleur entre une capsule contenant l'échantillon à analyser et une capsule servant de référence. Cette mesure permet d'enregistrer tous les changements d'états ou transitions (endothermiques ou exothermiques) de l'échantillon lorsqu'il est soumis à un cycle de température. Nous l'avons employé afin de déterminer les températures de fusion, les enthalpies de cristallisation et de fusion de notre polymère.

Les thermographes DSC des différents échantillons, traités ou non, lors du premier et unique passage de chauffe sont présentés sur la Fig. 50.

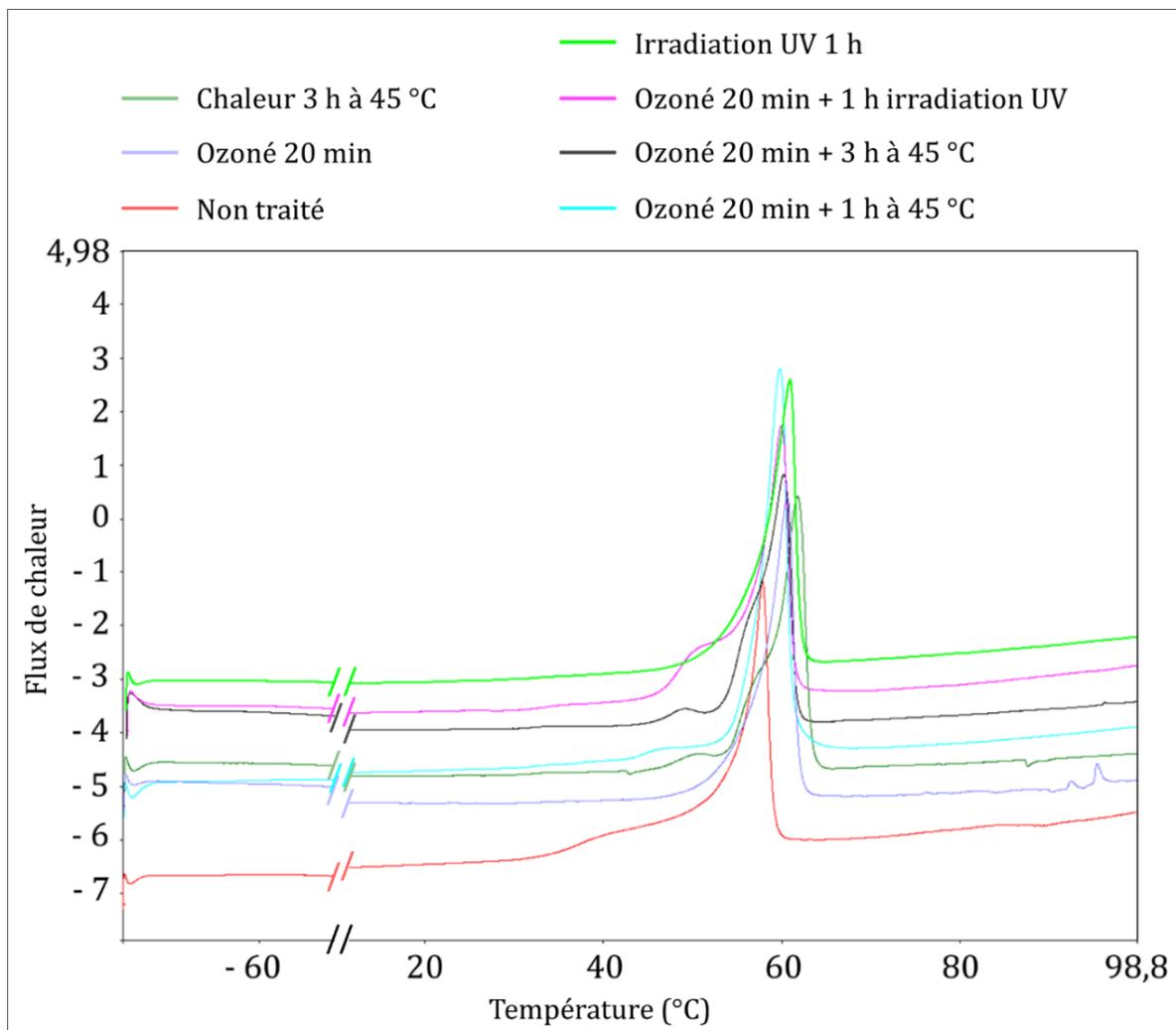


Figure 50: Thermographes DSC des échafaudages « μm » en fibres PCL traités ou non.

La superposition des thermographes DSC du PCL non traité et des différents échantillons traités montre, après les différents traitements subis une très légère

augmentation de la température de fusion du PCL, avec un décalage de la pointe du pic vers les hautes températures. Cependant, en comparant les thermogrammes des échantillons traités avec celui du PCL non traité, les différentes étapes de traitement semblent ne pas avoir affecté l'intensité des pics de fusion et l'allure générale des courbes. Ceci dit, étant donné que chaque échantillon analysé présente une masse différente des autres, les graphes ne pourront pas se superposer à la perfection, rendant l'interprétation des résultats, en se basant uniquement sur les graphes, impossible.

Les propriétés thermiques ; la température de fusion et le degré de cristallinité des échafaudages « μm » en fibre PCL non traités et traités analysés sont indiquées au Tableau 18. Les analyses ont été réalisées en triplicatas. Pour la mesure du degré de cristallinité du PCL, nous avons directement divisé la moyenne de chaque enthalpie de fusion (ΔH_m) sur le (ΔH_m^0) qui représente l'enthalpie de fusion du PCL 100 % cristallin, expliquant pourquoi il n'y a pas d'écarts type sur les mesures de (X_c).

Tableau 18 : Propriétés thermiques des échafaudages en fibre PCL non traités et traités.

Echantillons	T_m (°C)	X_c (%)
Non traité	58 ± 0.1	49.7
Ozoné 20 min	61 ± 0.4	52.7
Irradiation UV 1 h	60 ± 0.2	49.5
Chaleur 1 h à 45 °C	60 ± 0.4	48.9
Chaleur 3 h à 45 °C	60 ± 0.1	48.8
Ozoné 20 min + 1 h à 45 °C	61 ± 0.1	50.4
Ozoné 20 min + 3 h à 45 °C	61 ± 0.6	49.0
Ozoné 20 min + 1 h irradiation UV	61 ± 0.7	49.2

Le Tableau 18 regroupe les valeurs de la température de fusion (T_m), la température et le taux de cristallinité (X_c) du PCL en fonction des différents traitements. Le PCL non traité a montré une température de fusion de 58 °C et un degré de cristallinité (X_c) de 49.7 %, ce qui est conforme à la littérature [272].

Nous avons constaté que les étapes du processus de greffage, que ce soit par ozonation, chauffage ou irradiation UV, ont très légèrement augmenté la température de fusion, avec la plus haute (T_m) enregistrée sur les échafaudages ayant subi une ozonation de 20 min. La variation du degré de cristallinité suit, elle aussi, la même tendance avec une légère

variation des valeurs observées. En revanche, étant donné les écarts types faibles et le fait que les variations sur les valeurs ne dépassent pas au plus 2 unités, nous pouvons conclure qu'aucune variation significative des propriétés thermiques du PCL (T_m et X_c) n'est apparue après les différents traitements, quelle que soit la méthode de greffage utilisée (thermique ou UV) (Tableau 18). Il a déjà été démontré que le greffage thermique de polyNaSS sur des surfaces de film PCL n'altère pas les propriétés thermiques du PCL [272], mais ces résultats restent à confirmer par des études complémentaires sur les autres propriétés du PCL après le processus de greffage.

4.2.2.2 Chromatographie d'exclusion Stérique (SEC) :

Les masses molaires moyennes en nombre (M_n) et l'indice de polydispersité (\mathcal{D}) défini par le rapport entre M_w et M_n ($\mathcal{D} = \frac{M_w}{M_n}$) du PCL non traité et après les différents traitements sont mesurées par chromatographie d'exclusion stérique et sont regroupées dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Masses molaires moyennes en nombre (M_n) et indice de polydispersité (\mathcal{D}) des échafaudages « μm » en fibres PCL avant et après différents traitements.

Echantillons	M_n (g/mol)	\mathcal{D}
Non traité	160 627 ± 1490	2
Ozoné 20 min	146 190 ± 1179	2.3
Irradiation UV 1 h	161 881 ± 2111	1.8
Chaleur 1 h à 45 °C	159 701 ± 2292	1.9
Chaleur 3 h à 45 °C	160 548 ± 1173	1.9
Ozoné 20 min + 1 h à 45 °C	151 150 ± 1410	2.0
Ozoné 20 min + 3 h à 45 °C	149 749 ± 1271	2.0
Ozoné 20 min + 1 h irradiation UV	125 411 ± 3962	2.2

La première chose que nous pouvons noter est la diminution des masses molaires en nombre du PCL après un traitement à l'ozone. Cependant, lorsque nous observons la masse molaire moyenne en nombre des échantillons passés sous irradiation UV pendant 1 h, nous ne notons pas de différence avec celle du PCL pur. La diminution de la masse peut être expliquée par un effet agressif de l'ozonation sur la couche superficielle des fibres. L'indice de polydispersité quant à lui, reste assez stable de manière générale.

Cette diminution des masses pour les échantillons ozonés peut être attribuée à une légère dépolymérisation ou à une altération de la couche superficielle de la membrane sous l'effet de l'ozonation. La Figure 51 présente les courbes obtenues en SEC pour ces trois premières séries d'échantillons.

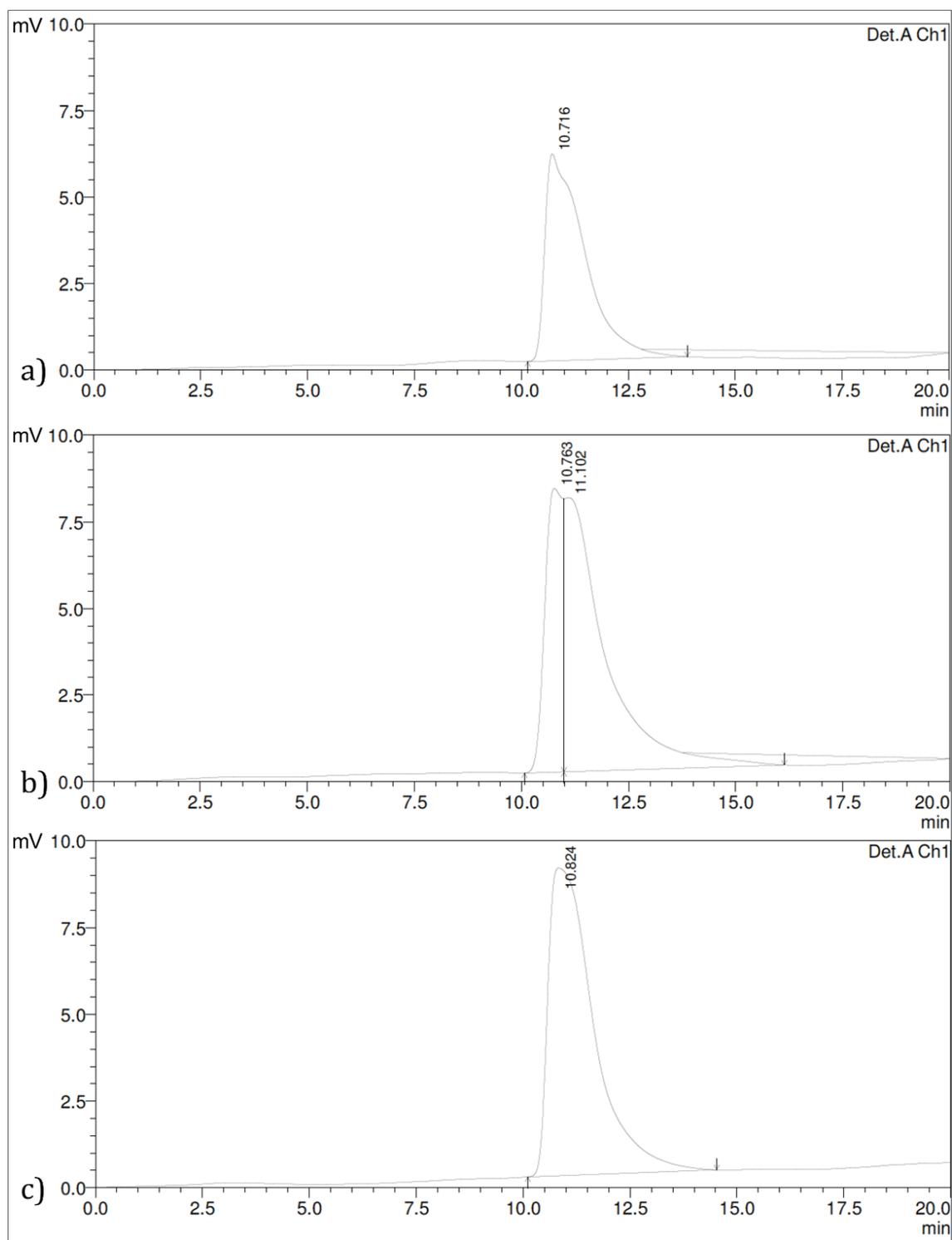


Figure 51 : Courbes SEC des échantillons ; a) Non traités, b) Ozonés 20 min et c) irradiés aux UV pendant 1h.

Pour les échantillons traités thermiquement à 45 °C pendant 1 h ou 3 h, nous pouvons observer que la masse molaire moyenne en nombre est stable. Concernant l'indice de polydispersité pour ces deux séries d'échantillons, il n'y a pas eu de variation significative. Sur la Figure 52, nous pouvons observer les 2 courbes SEC obtenues pour ces échantillons.

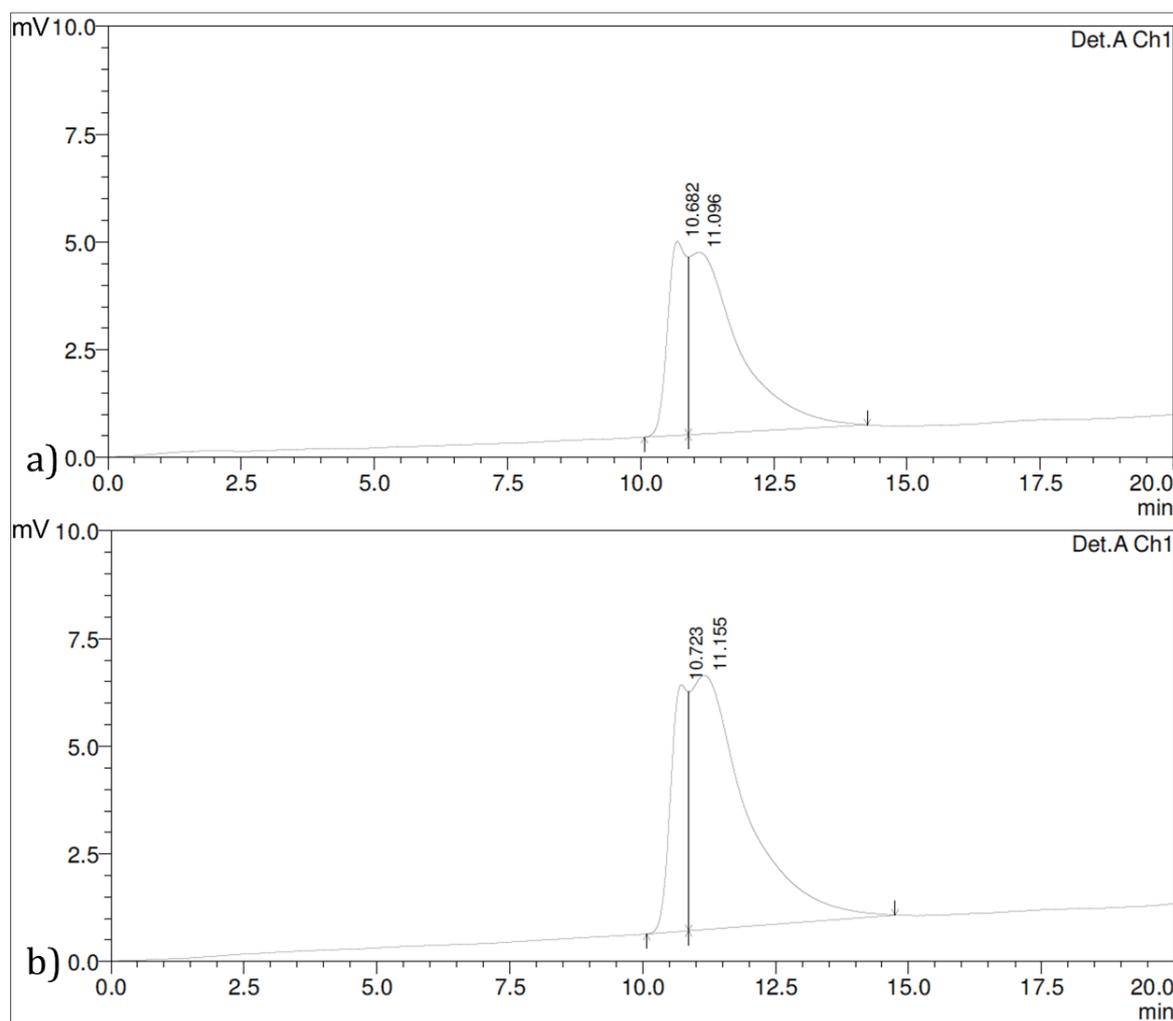


Figure 52 : Courbes SEC des échantillons traités à 45 °C pendant ; a) 1 h et b) 3 h.

Pour les trois dernières séries d'échantillons, reproduisant les étapes de traitement lors des processus de greffage thermique pendant 1 h ou 3 h ainsi que le greffage sous irradiation UV avec activation de la surface, nous avons noté une diminution des masses que ce soit pour les échantillons traités à 45 °C ou passés sous irradiation UV. Cette diminution peut nous confirmer que c'est bien l'étape d'ozonation qui semble avoir un effet sur la masse du polymère, en provoquant peut être des scissions de chaînes.

Cependant, nous avons noté une accentuation de cette diminution dans le cas d'un traitement aux UV précédé par cette étape d'ozonation.

Nous n'avons pas enregistré d'augmentation des masses molaires moyennes qui pourraient être dues à une réticulation du PCL en présence de traitements capable de générer des radicaux, et qui pourraient augmenter l'enchevêtrement des chaînes du polymère.

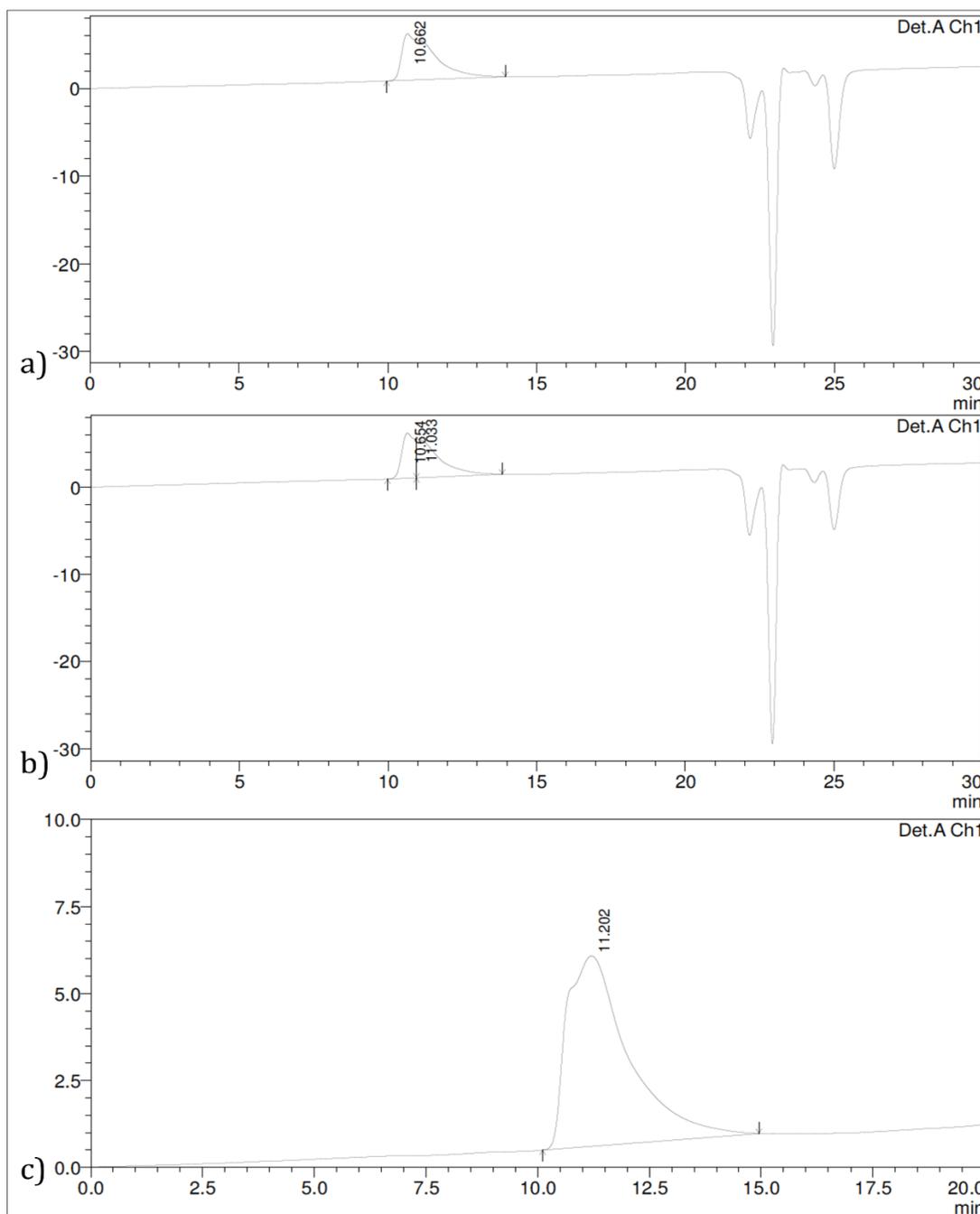


Figure 53 : Courbes SEC des échantillons ozonés et ayant subi par la suite ; a) chaleur à 45 °C pendant 1 h, b) chaleur à 45 °C pendant 3 h et c) irradiation UV pendant 1h.

Pour conclure : ces analyses SEC ont permis de vérifier qu'il n'a avait pas d'effet de la chaleur ou des irradiations UV seules sur la masse des échafaudages. Cependant, elles ont révélé un effet du processus d'ozonation, avec une diminution des masses qui semble être accentuée lorsque nous combinons les irradiations UV avec l'étape d'ozonation.

4.3 Etude des propriétés mécaniques des échafaudages :

La mesure précise des propriétés mécaniques des membranes électrofilées pour les applications biomédicales est essentielle, pour garantir qu'elles puissent résister aux forces lors d'une intervention chirurgicale et celles exercées par les forces physiologiques et/ou par la croissance tissulaire.

La réponse d'un matériau polymère aux forces externes peut varier en fonction des caractéristiques et des propriétés des matériaux, y compris la longueur de la chaîne, l'enchevêtrement des chaînes, les degrés de cristallinité et de réticulation, la température de transition vitreuse et la préparation des matériaux. L'application d'une force externe sur un matériau polymère lui fera subir un changement de forme et le matériau peut réagir de plusieurs façons : (i) le matériau peut ne pas retrouver ses dimensions d'origine et a donc été déformé de façon permanente ; (ii) le matériau se comporte élastiquement et reprend ses dimensions d'origine [312]. Le comportement global diffère d'un polymère à un autre (Fig. 54)

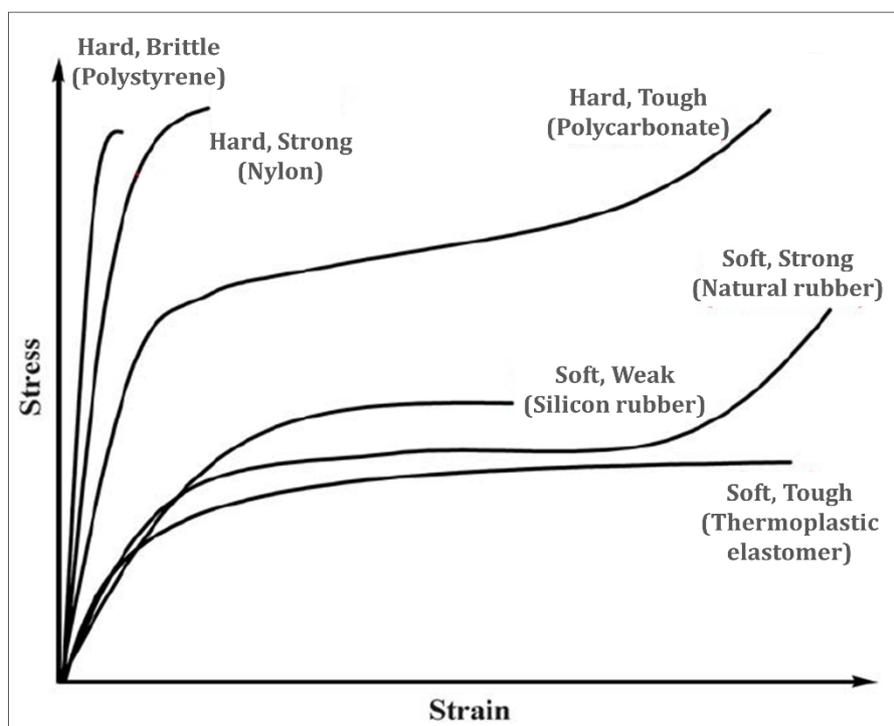


Figure 54 : Courbes contrainte-déformation de différentes classes de polymères.

Les essais de traction uni-axiale donnent des informations sur la résistance à la traction, sur le module d'élasticité ou module d'Young (E) (pente de la région linéaire

initiale de la courbe contrainte / déformation), la limite d'élasticité / déformation (fin de la partie élastique linéaire, début de la région plastique non linéaire), contrainte à la rupture / déformation (S_{\max}) et la déformation (ϵ_{\max}) maximale du maillage de fibres électrofilées ou d'une fibre simple.

Pour qu'un essai en mécanique soit précis et répétable, il est important de rapporter les dimensions macroscopiques (longueur d'éprouvette et section transversale), la vitesse de déformation, la charge appliquée, ainsi que l'épaisseur de l'échantillon. Il faut aussi préciser si les mesures ont été effectuées à température ambiante ou sous conditions physiologiques (à 37 °C, dans PBS ou dans du milieu de culture).

La plupart des articles qui rapportent les propriétés mécaniques des membranes électrofilées mesurent la surface de la section transversale d'un maillage très poreux de l'ordre de dizaines à centaines de microns, avec une précision de plusieurs dizaines de microns. L'erreur induite en procédant de la sorte, pourrait être une explication à l'importante variation observée dans les propriétés mécaniques rapportées pour des membranes électrofilées produites avec le même polymère.

Le diamètre des fibres permet de contrôler la porosité ainsi que la taille des pores. Moroni *et al.* (2006) [313] ont prouvé que pour tout autre paramètre constant, les fibres de diamètres importants engendrent des scaffolds dont la porosité est plus élevée.

L'orientation des fibres permet de varier la porosité et la dimension des pores. Ces deux paramètres influent bien évidemment sur les propriétés mécaniques. En effet, lorsqu'on peut faire varier la taille des pores et la porosité d'une structure, de drastiques effets peuvent être observés. Moroni *et al.* ont effectué une étude systématique de l'impact de l'architecture sur les propriétés physiques et mécaniques des scaffolds [313]. Ils ont montré que les propriétés mécaniques sont fonction de l'arrangement spatial des couches.

L'espacement entre les fibres est une caractéristique majeure de l'architecture des scaffolds. La dimension des pores et la porosité dépendent de cette valeur. Elle ne peut cependant pas être plus petite que la taille d'une fibre.

Dans cette étude, en utilisant des échafaudages issus de deux membranes en fibres électrofilées aux caractéristiques structurales ou morphologiques différentes, nous nous attendons à observer des différences en termes de propriétés mécaniques.

Les essais mécaniques sont réalisés après avoir mis au point un protocole de mesure adapté au type de matériau testé et à sa forme géométrique. Les tests sont menés dans le but de comparer les propriétés mécaniques des échafaudages entre eux, et de déterminer l'influence des étapes de fonctionnalisation sur les propriétés mécaniques.

Ces tests sont réalisés sur des éprouvettes type H3 ayant subies différents traitements. Premièrement, nous avons commencé par préparer les deux types de membranes en fibres PCL électrofilées. Les conditions de déposition de ces membranes sont présentées dans le Tableau 6 (paragraphe ; 4. 1. 2. 1).

A partir des membranes, sont découpées des éprouvettes type H3 qui vont servir d'échantillons pour ces tests mécaniques (Fig. 55). Sur chaque membrane, avec l'emporte-pièce, nous avons découpé trois éprouvettes, qui vont servir au même test (effectué en triplicata).

Ces éprouvettes présentent les dimensions suivantes (Fig. 55. droite):

- ✓ A : Longueur totale = 50 mm
- ✓ B : Largeur des têtes = 9.5 ± 0.1 mm
- ✓ C : Longueur de la partie utile = 17 ± 0.5 mm
- ✓ D : Largeur de la partie utile = 4 ± 0.1 mm



Figure 55 : (gauche) Découpe des éprouvettes sur une membrane en fibres PCL électrofilées et (droite) éprouvettes type H3.

L'épaisseur des échantillons testés a été mesurée à partir des micrographies MEB de la section utile des éprouvettes (Fig. 56). Cette mesure est effectuée sur des éprouvettes non traitées. Les valeurs obtenues, par mesure avec le logiciel « ImageJ » sont présentées dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Epaisseur des scaffolds utilisés pour les tests mécaniques.

Mesure	Membrane μm	Membrane nm
1	263.687	317.581
2	306.465	292.561
3	247.312	285.072
4	281.229	283.11
5	219.101	314.703
6	296.477	326.734
7	287.321	281.022
8	314.322	271.988
Moyenne (μm)	276.99	296.59
Ecart type	32.02	20.19

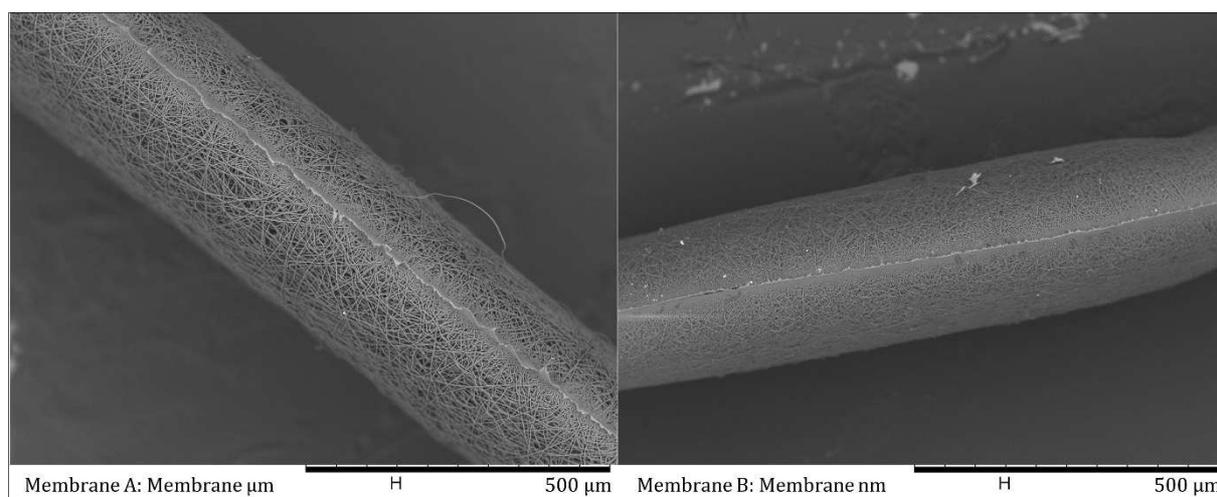


Figure 56 : Micrographies MEB de la section transversale des échafaudages : (droite) μm et (gauche) nm, pour la mesure de l'épaisseur.

Préalablement à la réalisation des tests mécaniques, la éprouvettes ont été, soit traitées sans introduire le monomère NaSS pour servir de conditions témoins, soit greffées, avec du polyNaSS, avec les conditions établies précédemment. Dans le Tableau 21 sont résumées, les différentes conditions testées.

Tableau 21 : Conditions de traitement/greffage des éprouvettes H3.

Eprouvettes H3	Condition
Témoins	Non traitées
	Ozonées 20 min
	Irradiation UV 1 h
	Chaleur 1 h à 45 °C
	Chaleur 3 h à 45 °C
Greffées polyNaSS	G Th 1 h - Oz 20 min
	G Th 3 h - Oz 20 min
	G UV 1 h - Oz 20 min
	G UV direct 1 h

Suite aux différents traitements, les éprouvettes sont lavées pendant 48 h à l'eau distillée, puis séchées dans une étuve à 37 °C, avant d'être testées. Pour permettre de réaliser une étude comparative entre les divers échantillons, tous les essais ont été réalisés à température ambiante, avec le même capteur de force et des pinces adaptées.

4.3.1 Essais mécaniques :

4.3.1.1 Essai de traction monotone :

4.3.1.1.1 Principe :

L'essai de traction permet de mesurer le degré de résistance à la rupture d'un matériau. Cet essai consiste à placer un échantillon du matériau à étudier entre les mors d'une machine de traction pour lui faire subir un étirement, à vitesse de déplacement constante du vérin jusqu'à sa rupture (si la course du vérin le permet).

Il consiste à soumettre une éprouvette à une contrainte unidirectionnelle à vitesse de sollicitation constante. On obtient la réponse du matériau à la charge sous la forme d'une courbe contrainte-déformation. Le système d'acquisition de données de l'appareil enregistre l'allongement et la force appliquée, que l'on convertit ensuite en déformation et contrainte nominales.

4.3.1.1.2 Protocole d'essai :

Ces tests de traction sont réalisés sur le banc d'essais de traction uni-axiale conçu au laboratoire, équipée d'un capteur de forces précis d'une capacité de 10 daN pour avoir des courbes sans bruits de fond. Les éprouvettes sont mise en place sur les pinces auto-serrantes spécialement adaptées à cet usage. La distance initiale entre les pinces est fixée à environ 3 cm, pour permettre la mise en place de l'éprouvette et avoir 1 cm de la tête de l'éprouvette tenue fermement par les pinces supérieure et inférieure de chaque côté, et la vitesse d'étirement est constante lors du test.

4.3.1.1.3 Résultats expérimentaux :

Une fois que les scaffolds ont été traités, lavés puis séchés, des essais de traction uni-axiale sont effectués à température ambiante. Les deux types de membranes ont été testés.

Nous présentons dans un premier temps le comportement global en traction avant de décrire les différentes conditions de traitements. Pour commencer, nous avons essayé trois vitesses d'étirement ; 0.1, 0.5 et 1 mm.s⁻¹, afin d'évaluer s'il y a un effet de la vitesse sur la réponse mécanique des membranes.

Les différentes courbes de contrainte-déformation en fonction de la vitesse d'étirement obtenues pour les éprouvettes non traitées des membranes « µm » et « nm » sont présentées dans la Figure 57 et détaillées sur les Figures 58 et 59. Il s'agit de courbes individuelles représentatives du comportement observé pour chaque vitesse.

Les courbes devraient présenter un comportement caractéristique de structures textiles non-tissées. L'examen de l'allure des courbes doit permettre de distinguer quatre parties différentes :

- **Domaine I :** C'est la zone de réorganisation des fibres constitutives de l'éprouvette. Dans cette partie de la droite, la force de traction va entraîner le mouvement des fibres qui se déplacent. La pente de la droite augmente de façon constante et le réseau fibreux s'allonge. Cette partie est caractéristique des matériaux fibreux. Le comportement est linéaire et réversible, en l'occurrence dans ce genre de cas, caractéristique d'une structure textile non-tissé.

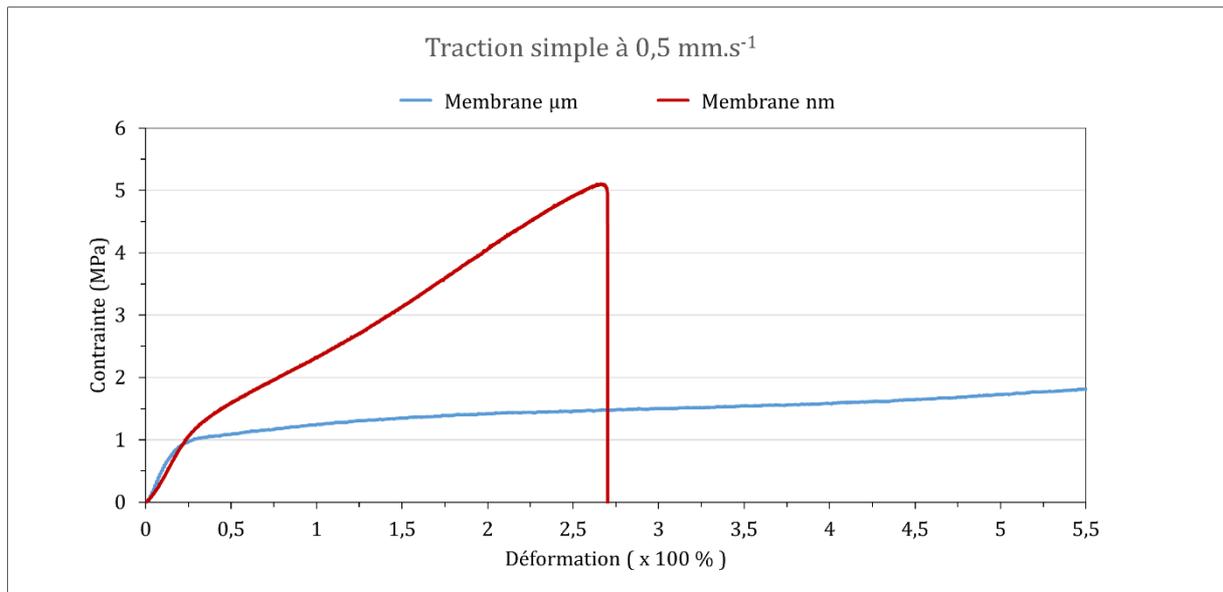


Figure 57 : Comportement global en traction des deux membranes testées à 0.5 mm.s⁻¹.

- **Domaine II** : C'est la zone où commence à s'étirer les fibres. Dans ce domaine, ce sont les fibres qui s'étirent car leurs mouvements sont très limités. En effet, les fibres sont bloquées les unes entre les autres et la structure fibreuse est figée. Ce réseau fibreux, bien que maintenu par des entremêlements de fibres, affiche une bonne rigidité.
- **Domaine III** : Cette troisième zone débute juste après le premier point d'inflexion (Yield point). Ce domaine correspondant à l'apparition des premiers phénomènes de rupture de fibres. Dans cette zone, l'augmentation de la force de traction entraîne un déchirement de la matière.
- **Domaine IV** : Cette zone est caractérisée par un fléchissement de la contrainte en fonction de la déformation. Dans cette zone les fibres sont rompues jusqu'au déchirement complet des éprouvettes (si la course du vérin le permet).

Dans cette étude, pour simplifier l'analyse, les courbes contrainte-déformation des éprouvettes pour les deux membranes en fibres PCL électrofilées peuvent être partagées en deux domaines (clairement observables) (Fig. 58 et 59) : (I) un premier domaine correspondant au domaine élastique, suivi par (II) un domaine plastique, allant jusqu'à rupture des éprouvettes pour la membrane « nm » (Fig. 59), mais qui se prolonge jusqu'à 550 % de déformation sans atteindre la rupture pour la membrane « μm » (Fig. 58).

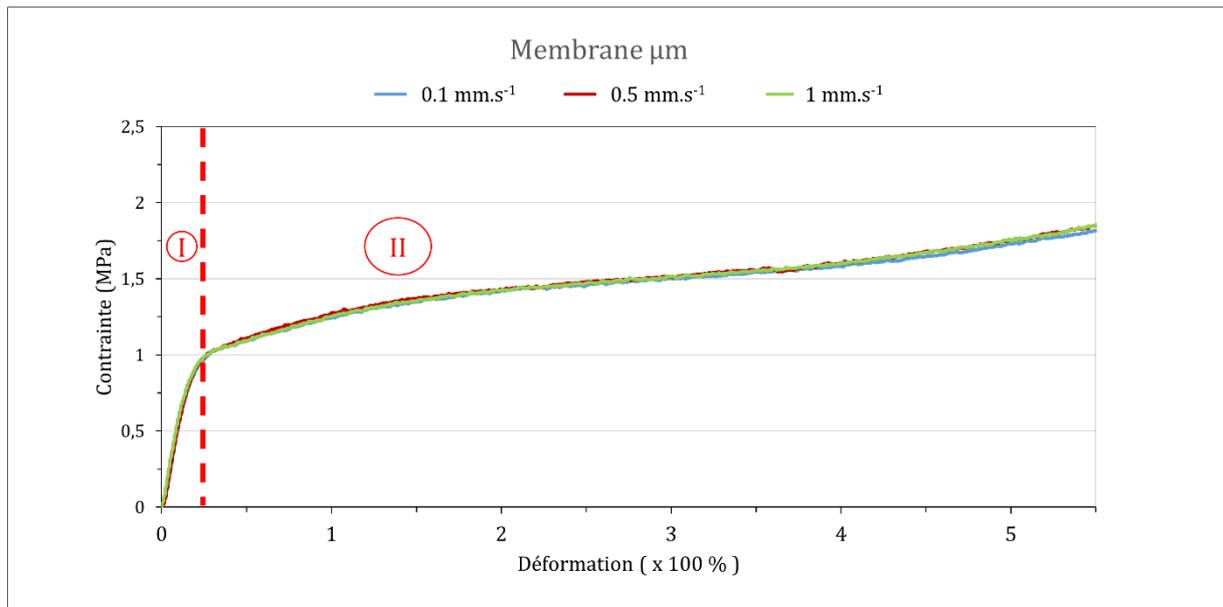


Figure 58 : Comportement en traction des membranes « μm » non traitées en fonction de la vitesse d'étirement.

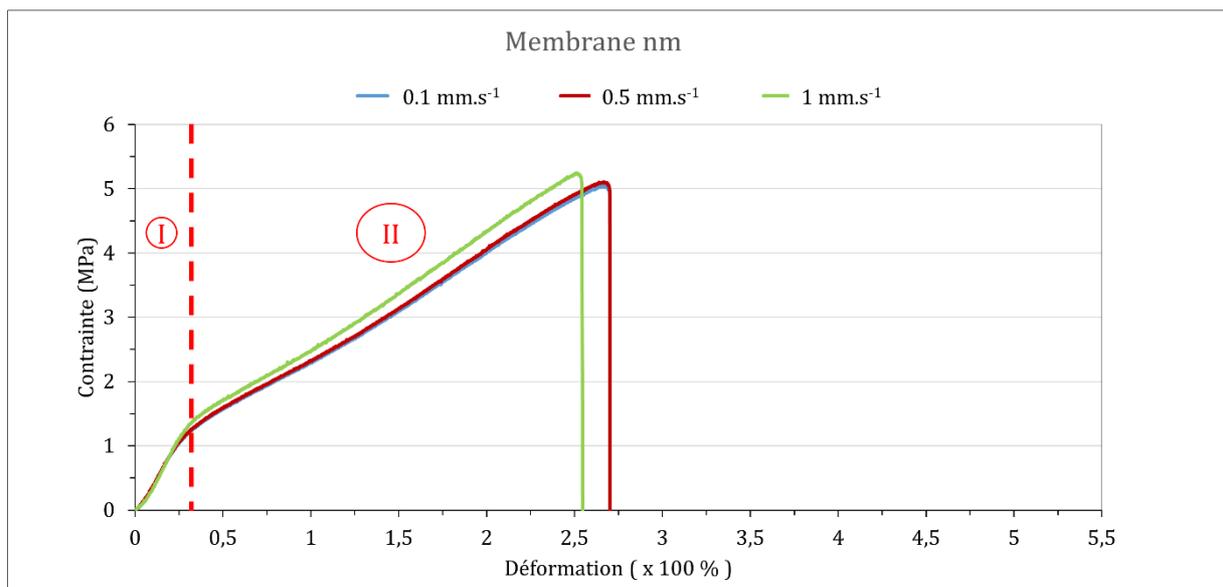


Figure 59 : Comportement en traction des membranes « nm » non traitées en fonction de la vitesse d'étirement.

La zone de déformation élastique s'échelonne de 0 à 25 % de déformation pour la membrane « μm » et de 0 à 27 % pour la membrane « nm ». Au-dessus de cette contrainte et de cette déformation, les éprouvettes se déforment de manière irréversible et se détériorent. Ainsi dans une gamme de 0.1 à 1 mm.s⁻¹, la vitesse d'étirement n'influe pas sur le comportement en traction de ces deux membranes en fibres PCL électrofilées, puisque les courbes des différentes vitesses sont presque identiques.

Le module d'élasticité, la contrainte et la déformation maximale ont été calculés et le Tableau 22 rassemble ces valeurs.

Tableau 22 : Propriétés mécaniques en traction des membranes « μm » et « nm » non traitées.

	Membrane μm			Membrane nm		
	0.1 mm/s	0.5 mm/s	1 mm/s	0.1 mm/s	0.5 mm/s	1 mm/s
E (MPa)	5.5 ± 0.1	5.55 ± 0.1	5.39 ± 0.2	5.22 ± 0.5	5.12 ± 0.1	5.18 ± 0.4
Déformation Max (%)	> 550	> 550	> 550	269 ± 7	264 ± 5	256 ± 6
Contrainte Max (MPa)	1.85 ± 0.3	1.81 ± 0.1	1.87 ± 0.3	5.06 ± 0.1	5.07 ± 0.1	5.15 ± 0.4

Pour la membrane « μm », la rupture n'a pas pu être atteinte pour toutes les vitesses testées, et ce probablement à cause de la course du vérin qui n'excède pas les 10 cm. Le module d'élasticité et la contrainte maximum (enregistrée à 550 % de déformation) ne varient pas en fonction de la vitesse de sollicitation.

Pour la membrane « nm », la déformation maximale se situe autour de 263 % et la contrainte à rupture est d'environ 5.09 MPa. Le module d'élasticité quant à lui ne varie pas en fonction de la vitesse.

La vitesse d'étirement semble ne pas avoir d'impact sur les caractéristiques des deux zones, que ce soit la zone élastique ou plastique dans cette gamme de vitesses choisie. En comparant les courbes entre les deux membranes, nous pouvons observer que la membrane « μm » présente une plus grande élasticité (déformation max > 550 %, Fig 60) que la membrane « nm » qui atteint la rupture à une déformation d'environ 263 %. Cependant, cette membrane « nm » présente une meilleure résistance à la traction, avec une contrainte maximum atteinte juste avant rupture égale à environ 5.09 MPa.



Figure 60 : Eprouvette d'une membrane « μm » ; A) avant l'essai de traction et B) après l'essai de traction.

Cette différence dans le comportement en traction peut être expliquée par la différence de microstructure des deux membranes. Pour mieux comprendre ces deux comportements, nous avons analysé la morphologie des deux membranes, à partir de micrographies MEB, prises suite à un essai de traction, avec 0.5 mm.s^{-1} comme vitesse d'étirement (Fig. 61).

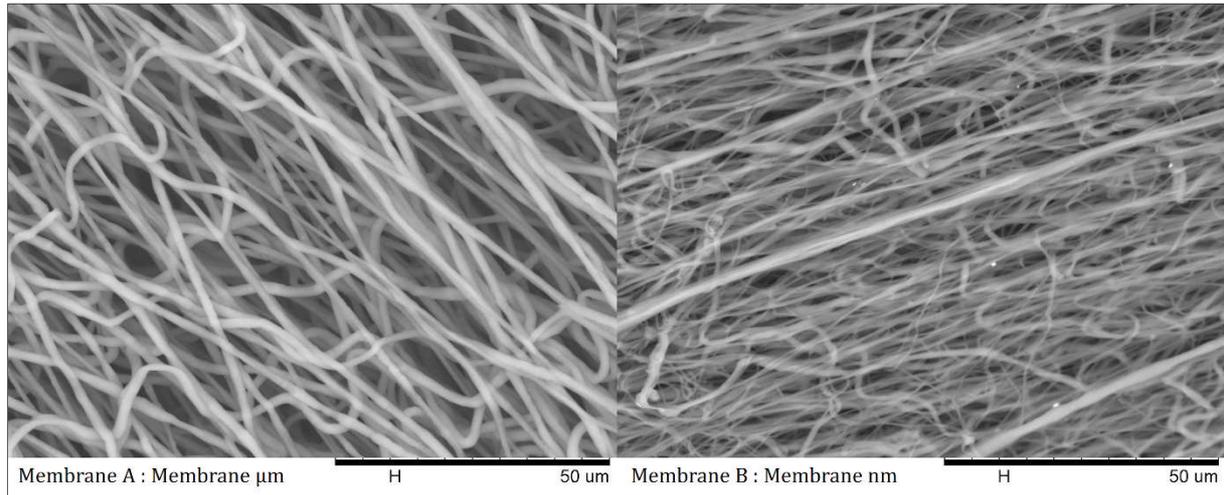


Figure 61 : Micrographies MEB, après un essai de traction, sur; (droite) membrane nm et (gauche) membrane μm .

Après analyse des micrographies, nous pouvons observer que le réseau de fibres de la membrane « μm » (Fig. 61. gauche) se comporte comme un accordéon. Les paramètres de déposition de cette membrane ont permis d'avoir un réseau de fibres apposé en couches sans qu'il n'y ait de fusion entre les fibres. Cela donne un grand degré de liberté aux fibres, pour s'arranger et se mouvoir lors de l'essai de traction, conférant ainsi à la membrane une grande capacité à s'étirer sous contrainte.

La membrane « nm » quant à elle, présente un autre comportement. Les conditions de déposition ont introduit des points de fusion entre les fibres électrofilées, à cause d'une évaporation du solvant plus lente (distance de déposition plus courte), limitant ainsi la liberté des fibres pour se réarranger lorsque la membrane subit une contrainte en traction. En effet, les fibres sont bloquées les unes entre les autres et la structure fibreuse est figée. Par ailleurs, les points de fusion entre les fibres augmentent la résistance de la membrane. Pour résumer, la première membrane est très flexible mais moins résistante, et la seconde est beaucoup moins flexible, mais présente une résistance à la traction nettement accrue (65 %). Ces résultats sont en accord avec la littérature [88].

Après avoir défini un comportement global, nous avons choisi une vitesse de sollicitation de 0.5 mm.s^{-1} pour effectuer des analyses plus poussées sur les différents échantillons traités. Les courbes contrainte-déformation des différents échantillons traités et témoins sont présentées en Figure 62.

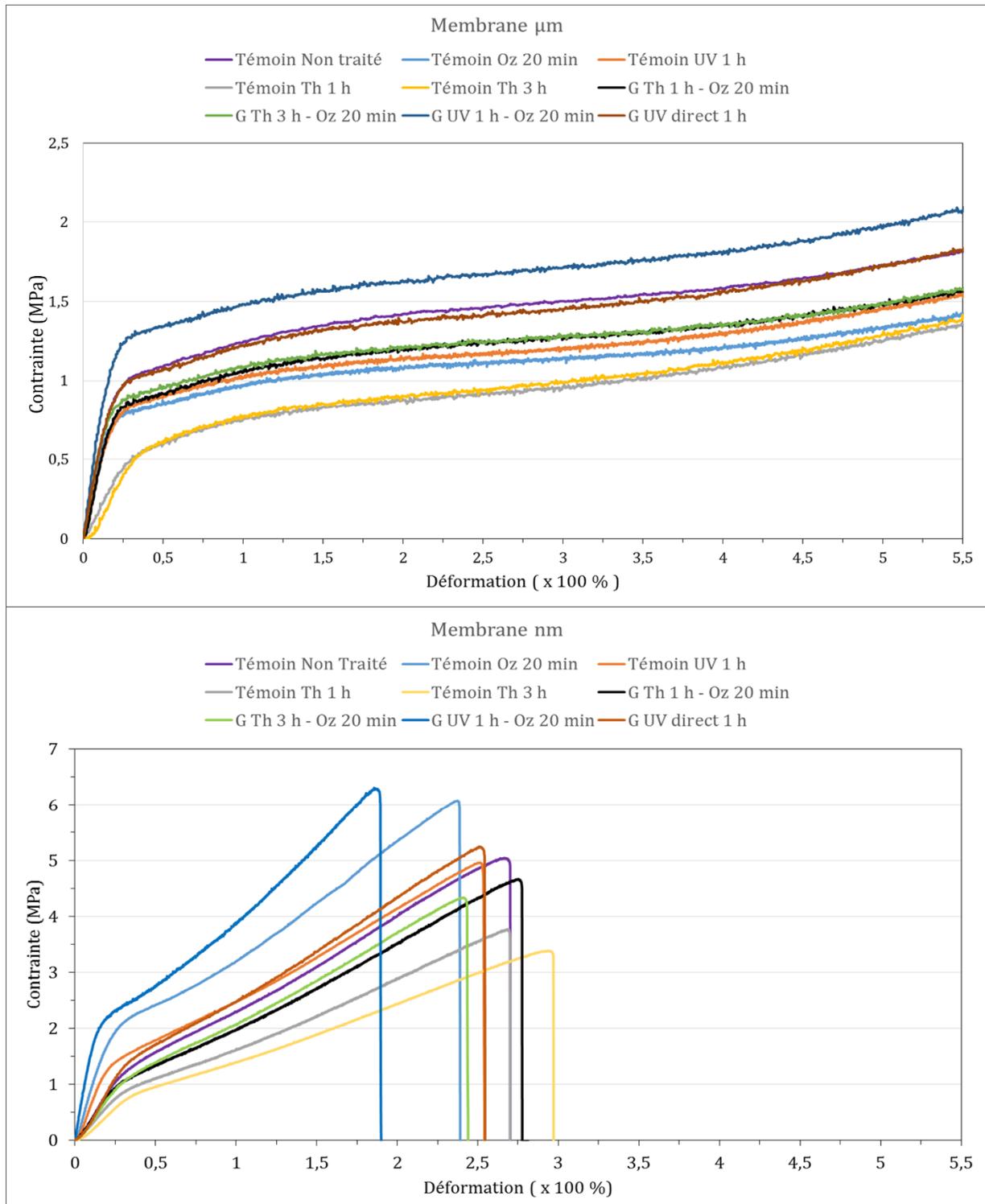


Figure 62 : Courbes contrainte-déformation, à 0.5 mm.s^{-1} , des éprouvettes traités/gréffées et témoins : (en haut) Membrane μm et (en bas) Membrane nm .

Les modules d'élasticité, les contraintes et les déformations maximales pour les différents échantillons témoins et greffés ont été calculés et résumés dans le Tableau 23.

Les valeurs obtenues pour les deux membranes présentent beaucoup de ressemblances d'une manière générale. Les résultats sont reproductibles comme il a été vérifié par superposition des courbes contrainte-déformation sur les échantillons non traités. Les modules d'élasticité, en comparant les deux membranes sur chaque condition testée, ne varient pas beaucoup. Nous supposons que les légères variations observées entre les deux membranes sont dues simplement à des variations dans l'épaisseur des éprouvettes.

Lorsque nous comparons les valeurs de déformation maximales, la première chose que nous notons est l'absence de rupture pour toutes les éprouvettes de la membrane « μm » quel que soit la condition de traitement. Nous supposons que ces éprouvettes pourraient encore se déformer plus, si la course du vérin le permettait.

La déformation maximale pour toutes les éprouvettes de la membrane « nm » a été enregistrée au point de rupture. En ce qui concerne les contraintes maximales, les mesures confirment les tendances révélées sur les courbes contrainte-déformation des échantillons témoins. La membrane « nm », sur toutes les conditions testées, enregistre les contraintes maximales les plus élevées, confirmant de ce fait, que cette propriété de résistance à la traction accrue, est intrinsèque à la membrane lors de sa mise en œuvre.

Les caractéristiques mécaniques des échantillons après chaque étape de traitement ont été déterminées et ont montré que :

- ✓ L'étape d'ozonation semble avoir un impact sur les caractéristiques mécaniques des éprouvettes ; les modules d'Young (E) ont augmenté après chaque traitement d'ozonation. Cela est observé sur les éprouvettes témoins ozonées pendant 20 min (module d'Young pour la membrane « μm » passe de 5.48 ± 0.3 MPa à 6.03 ± 0.24 MPa et pour la membrane « nm » de 5.12 ± 0.19 MPa à 6.68 ± 0.18 MPa). Cette augmentation du module d'Young semble être clairement amplifiée pour le greffage sous irradiation UV (G UV 1 h – Oz 20 min) puisque nous enregistrons des modules d'Young de 7.99 ± 0.4 MPa et 9.56 ± 1.36 MPa, respectivement pour les membranes « μm » et « nm » (Fig. 63). Les valeurs de déformation maximale, semblent diminuées après l'ozonation pour les éprouvettes de la membrane « nm », surtout les éprouvettes greffées UV 1 h – Oz 20

min qui ont atteint le point de rupture à juste 190 % de déformation, mais cet effet de l'ozonation sur la déformation n'a pu être confirmé sur les éprouvettes de la membrane « μm » à cause de la limite sur la course du vérin (déformation > 550 %) (Fig. 64).

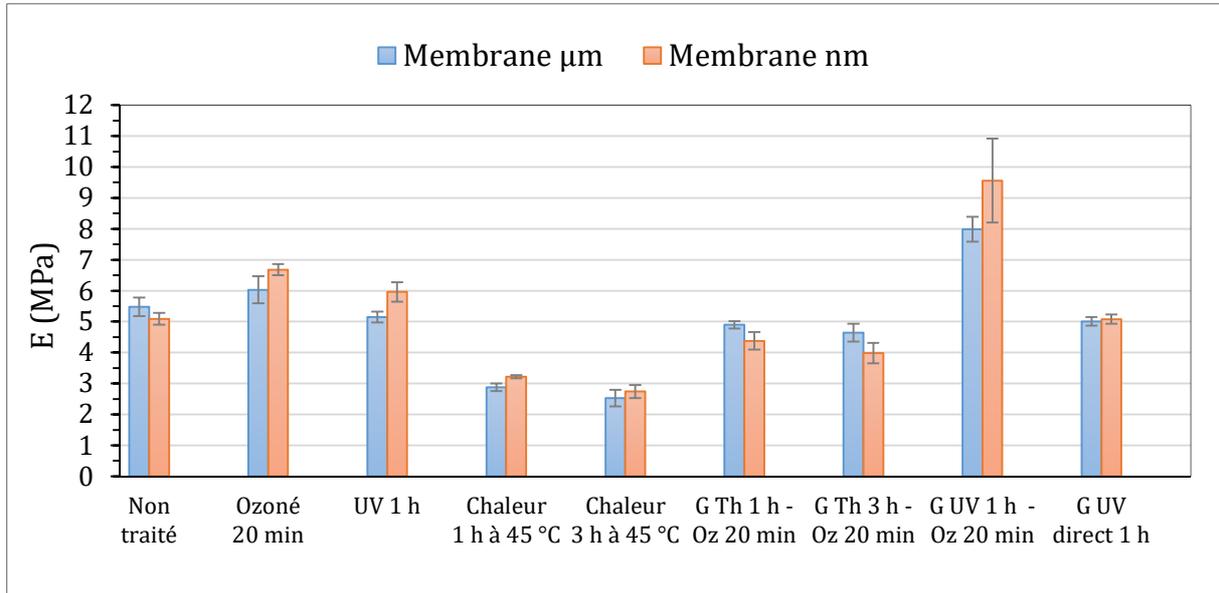


Figure 63 : Variation des modules d'Young (E) sur les échantillons testés à 0.5 mm.s⁻¹.

Les valeurs des contraintes maximales pour les échantillons ayant subi une ozonation ont quant à elles augmenté de façon significative (Fig. 65), dans le cas de la membrane « nm », ce qui pourrait être expliqué par une rigidification du matériau suite à ce traitement.

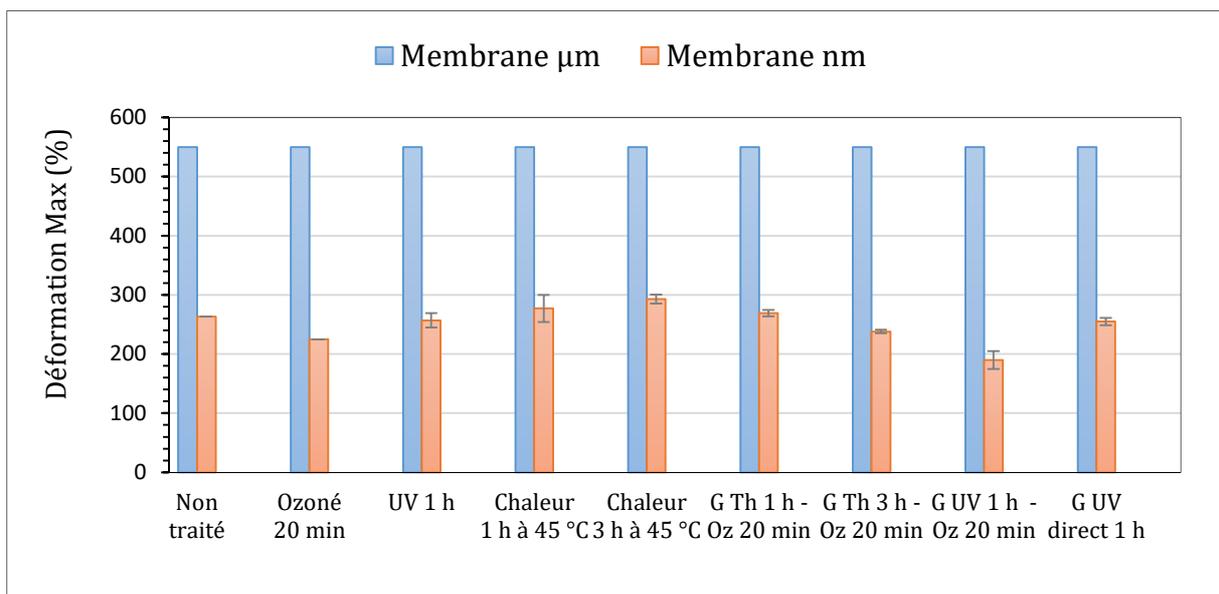


Figure 64 : Variation des valeurs de déformation Max sur les échantillons testés à 0.5 mm.s⁻¹.

Tableau 23 : Données mécaniques obtenues à partir des courbes expérimentales des différents échantillons des membranes « μm » et « nm » à 0.5 mm.s^{-1} .

Condition	Membrane « μm »			Membrane « nm »			
	E (MPa)	Déformation Max (%)	Contrainte Max (MPa)	E (MPa)	Déformation Max (%)	Contrainte Max (MPa)	
Témoins	Non traité	5.48 ± 0.30	> 550	1.81 ± 0.1	5.12 ± 0.19	263 ± 5.2	5.09 ± 0.12
	Ozoné 20 min	6.03 ± 0.24	> 550	1.42 ± 0.04	6.68 ± 0.18	225 ± 8.7	6.04 ± 0.48
	UV 1 h	5.15 ± 0.18	> 550	1.62 ± 0.11	5.96 ± 0.31	257 ± 12.1	4.92 ± 0.25
	Chaleur 1 h à $45 \text{ }^\circ\text{C}$	2.88 ± 0.12	> 550	1.35 ± 0.12	3.22 ± 0.05	277 ± 22.8	3.71 ± 0.36
	Chaleur 3 h à $45 \text{ }^\circ\text{C}$	2.53 ± 0.27	> 550	1.40 ± 0.09	2.74 ± 0.21	293 ± 7.5	3.36 ± 0.15
Greffés	G Th 1 h - Oz 20 min	4.90 ± 0.12	> 550	1.57 ± 0.02	4.38 ± 0.28	269 ± 5.5	4.64 ± 0.29
	G Th 3 h - Oz 20 min	4.64 ± 0.29	> 550	1.56 ± 0.05	3.98 ± 0.33	238 ± 1.9	4.30 ± 0.54
	G UV 1 h - Oz 20 min	7.99 ± 0.40	> 550	2.08 ± 0.06	9.56 ± 1.36	190 ± 15.1	6.27 ± 0.65
	G UV direct 1 h	5.01 ± 0.14	> 550	1.82 ± 0.08	5.08 ± 0.15	255 ± 6.3	5.21 ± 0.09

- ✓ L'exposition aux irradiations UV seule, n'a semble-t-il, pas d'effet sur les caractéristiques mécaniques des éprouvettes, que ce soit dans le cas d'un simple traitement aux UV ou d'un greffage UV direct 1 h. En effet, il n'y pratiquement pas de différences notables entre des échantillons témoins ou ceux passés sous irradiations UV (sauf quand cette étape est précédé par une ozonation).
- ✓ L'exposition à la chaleur à 45 °C pendant 1 h ou 3 h a révélé un effet sur les caractéristiques des éprouvettes. En effet, il y a eu une chute brutale des modules d'Young pour les échantillons traités à 45 °C ; car nous sommes passé de 5.48 ± 0.3 MPa à 2.88 ± 0.12 MPa après une heure et à 2.53 ± 0.27 MPa après 3 h pour la membrane « μm », et de 5.12 ± 0.19 MPa à 3.22 ± 0.05 MPa et 2.74 ± 0.21 MPa pour la membrane « nm ». Cependant, la diminution a été moins évidente sur les échantillons greffés Th 1 h et Th 3 h (avec ozonation préalable), et cela est certainement dû à l'effet de l'ozonation qui semble augmenter le module d'Young.

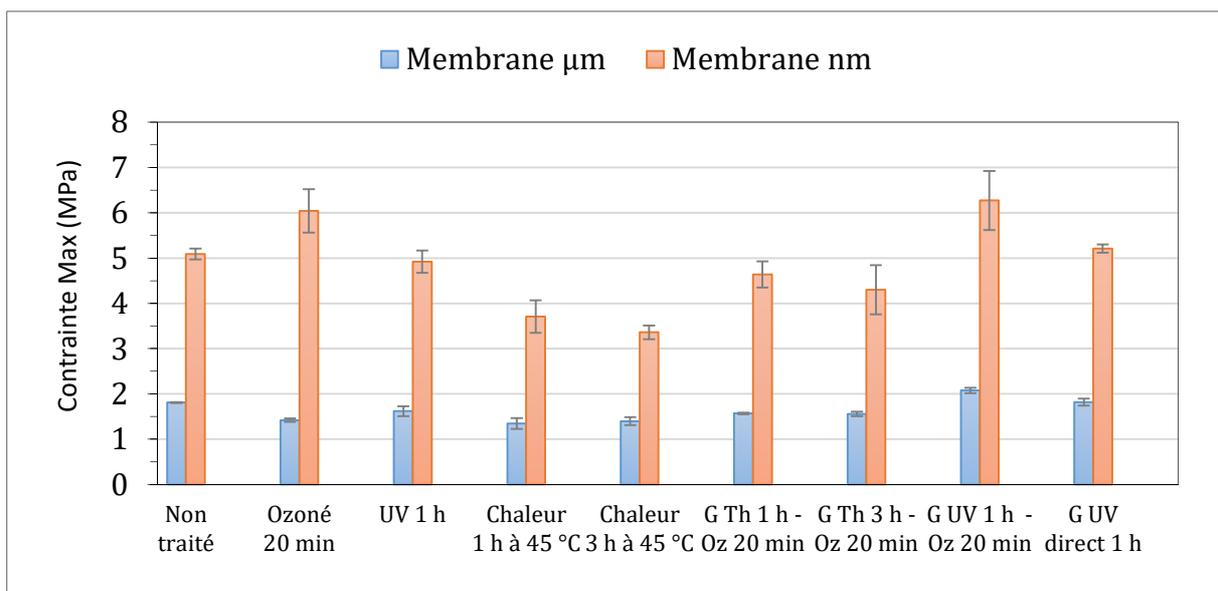


Figure 65 : Variation des valeurs de contrainte Max pour les échantillons testés à 0.5 mm.s^{-1} .

Avec cette diminution des modules d'Young, nous avons eu aussi une nette diminution de la contrainte Max pour ces éprouvettes (Témoin Th 1 h et 3 h, et G Th 1 h – Oz 20 min et G Th 3 h – Oz 20 min). De plus, sur les éprouvettes de la membrane « nm », la chaleur n'a pas provoqué d'effet marqué sur la déformation max.

En résumé, seul l'exposition aux irradiations UV, que ce soit pour un simple traitement ou un greffage sous UV direct 1 h (sans ozonation), n'a pas eu d'effet évident sur les

caractéristiques mécaniques de ces éprouvettes témoins ou greffées, que ce soit sur la membrane « μm » ou « nm ». Les autres traitements physico-chimiques semblent altérer plus ou moins les caractéristiques des éprouvettes. L'ozonation semble provoquer une rigidification du polymère se traduisant par un module d'Young plus élevé, une augmentation des contraintes et diminution des déformations Max. L'association de l'ozonation et des irradiations UV dans le cas des greffages UV 1 h – Oz 20 min semble être la plus agressive pour les deux membranes.

Etant donné que ce travail traite de quatre différents greffages, ce sont les associations des traitements physico-chimiques qui nous intéressent le plus, nous pouvons dire qu'à part le greffage UV 1 h – Oz 20 min, les autres greffages semblent respecter plus ou moins l'intégrité structurelle et constitutionnelle des deux membranes. Cepemmmmmndant, ces variations des propriétés mécaniques doivent être confirmées sur un plus grand nombre d'échantillons avec une étude statistique.

4.3.1.2 Essai de traction alternée avec cycles de charge-décharge :

4.3.1.2.1 Principe :

Les essais avec cycles de charge-décharge mettent en évidence un comportement hystérétique des polymères qui se traduit sous forme de boucles dans l'espace des contraintes et des déformations. La variation du module d'Young est étudiée en appliquant alternativement des périodes de charge-décharge aux éprouvettes.

4.3.1.2.2 Protocole d'essai :

Ce test est réalisé dans les mêmes conditions que l'essai de traction monotone. La réalisation de ce test consiste à étirer une éprouvette jusqu'à une déformation donnée, ce qui constitue l'étape de charge (pendant 20 secondes à $0.5 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$), puis une décharge est effectuée pendant 10 secondes toujours à la même vitesse de déplacement du vérin de $0.5 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$. Ces cycles de charge-décharge sont répétés jusqu'à la limite du capteur de déplacement (course de 50 mm). Huit cycles de charge-décharge sont ainsi réalisés sur chaque échantillon. Le module d'Young de chaque hystérésis est mesuré. Par la suite, la courbe des modules d'Young en fonction de la déformation est tracée.

4.3.1.2.3 Résultats expérimentaux :

Une fois que les scaffolds ont été lavés et séchés après chaque traitement, un essai de traction alterné est effectué à température ambiante. La vitesse d'étirement est de 0.5 mm.s^{-1} . Le capteur de déplacement, d'une course de 50 mm enregistre le déplacement en fonction de la force appliquée sur l'éprouvette. Le vérin a été programmé pour effectuer des cycles de charge-décharge sur des temps de 20 secondes pour chaque charge, et 10 secondes pour chaque décharge. Les résultats sont enregistrés et des courbes force-déplacement sont tracés pour chaque série d'échantillons. La Figure 66 présente la différence entre deux courbes force-déplacement pour les deux membranes non traitées.

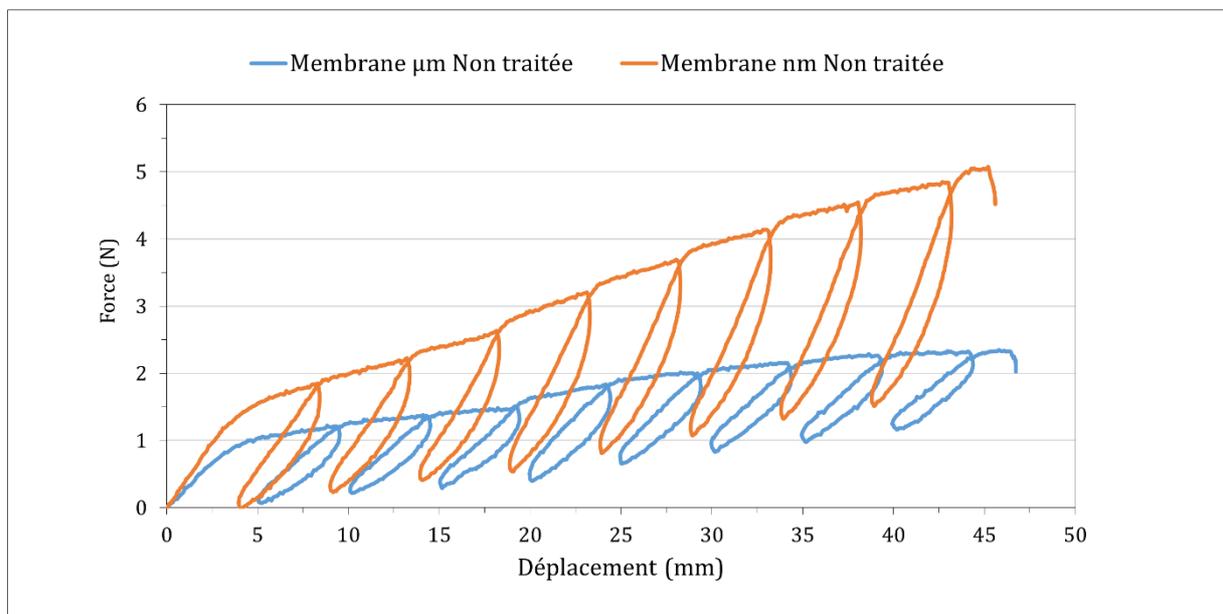


Figure 66 : Courbes force-déplacement et comparaison des hystérésis pour les éprouvettes des membranes « μm » et « nm ».

Comme dans le cas des courbes contrainte-déformation, nous avons observé des différences entre les deux membranes. La réponse des membranes « nm » se situe bien au-dessus des membranes « μm », avec des boucles d'hystérésis beaucoup plus longues pour ces membranes « nm ».

Sur chaque hystérésis, nous avons mesuré le module d'Young et la déformation de l'éprouvette juste avant le cycle de décharge. Les Figures 67 et 68, montrent la variation des modules d'Young des hystérésis en fonction de la déformation. Nous nous sommes intéressés aux éprouvettes greffées pour chaque membrane.

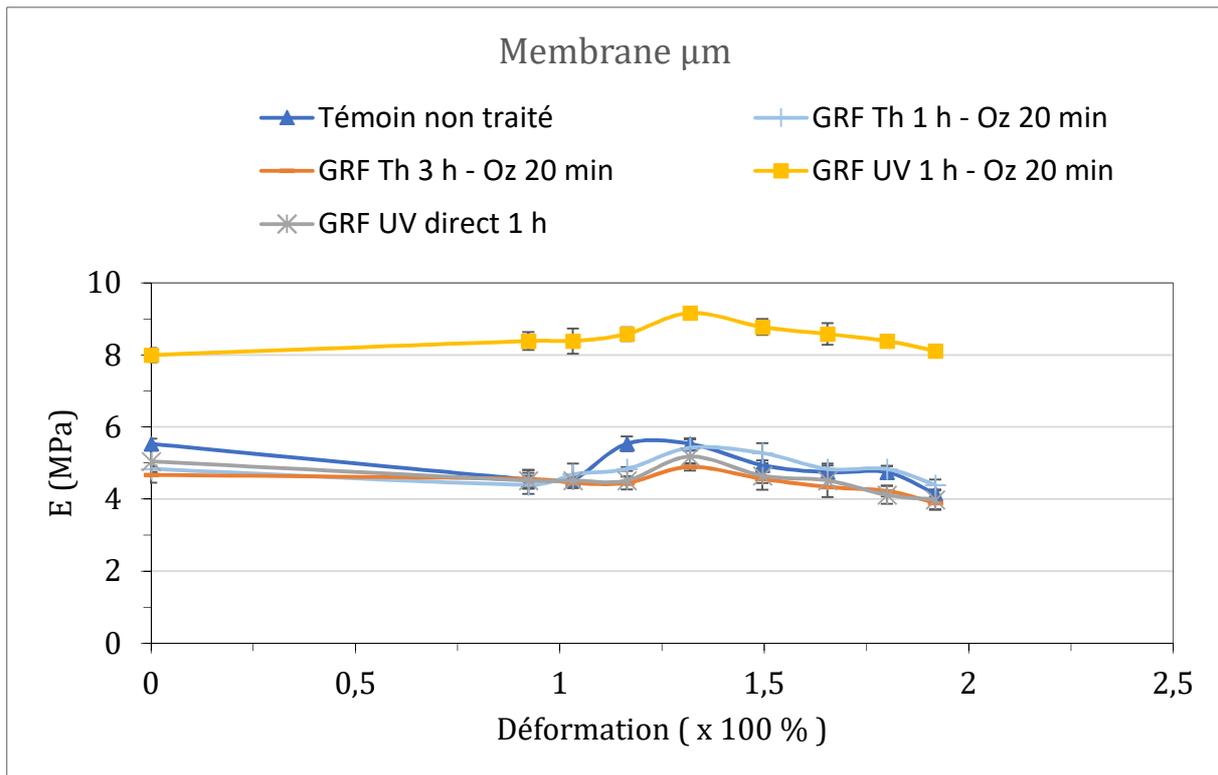


Figure 67 : Variation des modules d'Young des hystérésis en fonction de la déformation, pour la membrane « μm ».

Pour la membrane « μm » (Fig. 67) ; les échantillons greffés par voie thermique (G Th 1 h et 3 h, avec Oz 20 min), nous avons observé une légère diminution des modules d'Young tout au long du test pour arriver à la fin du test à des module d'Young de 4.4 ± 0.15 MPa pour les éprouvettes G Th 1 h – Oz 20 min et à 3.89 ± 0.17 MPa pour les éprouvettes G Th 3 h – Oz 20 min. Le greffage UV direct 1 h a lui aussi conduit à une diminution des modules d'Young en passant de 5.05 ± 0.3 MPa à 3.98 ± 0.24 MPa à la 8^{ème} hystérésis (8^{ème} et dernier cycle). Les modules d'Young sur les éprouvettes non traitées ont suivi la même tendance que pour un greffage UV direct 1 h. Cependant, sur les éprouvettes greffées UV 1 h – Oz 20 min, les modules d'Young n'ont pas subi de décroissance, mais plutôt une augmentation tout au long du test, avec la plus haute valeur égale à 9.16 ± 0.16 MPa enregistrée à la quatrième hystérésis. Sur cette série, le module d'Young initial (7.99 ± 0.2 MPa) est inférieur à celui de la dernière hystérésis (8.11 ± 0.09 MPa).

Ces résultats indiquent, que ce sont les éprouvettes greffées UV 1 h – Oz 20 min qui ont été le plus touchées par le processus de greffage, cela étant dû certainement à cette combinaison du traitement d'ozonation avec le passage sous irradiations UV.

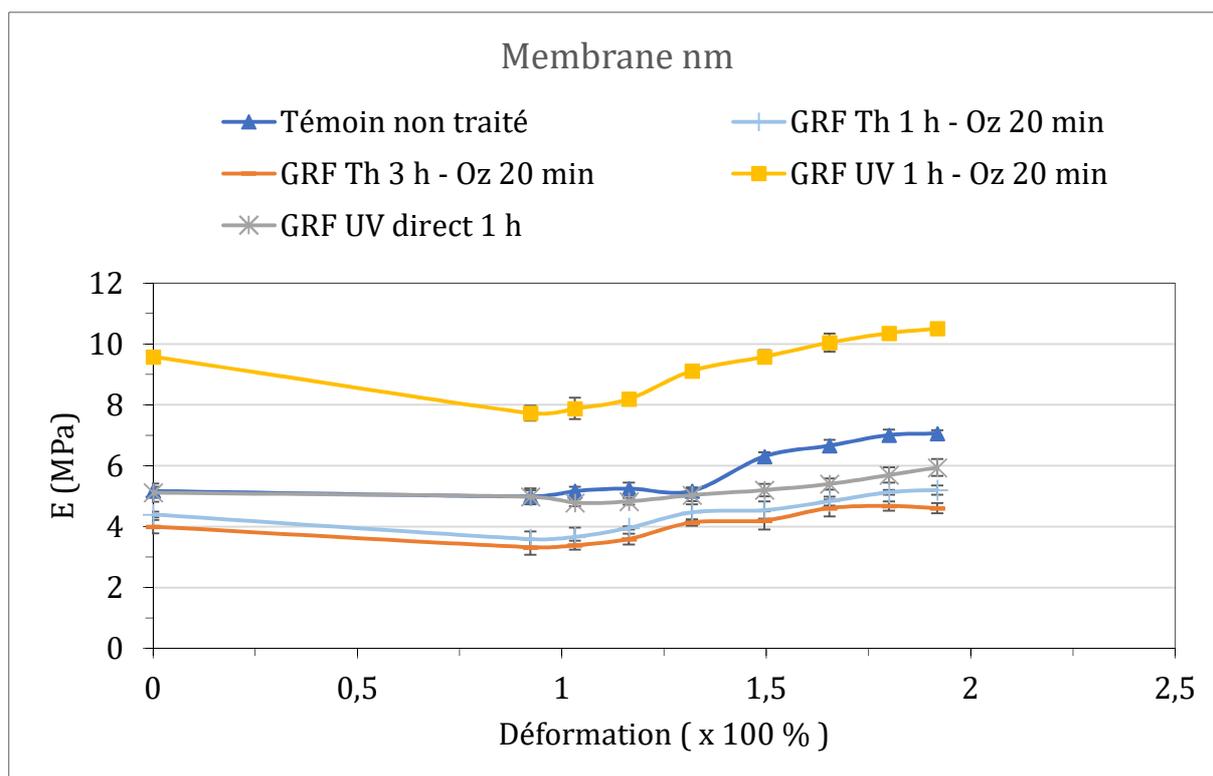


Figure 68 : Variation des modules d'Young des hystérésis en fonction de la déformation, pour la membrane « nm ».

La Figure 68 montre les résultats obtenus pour les éprouvettes de la membrane « nm ». Nous avons observé que la variation du module d'Young en fonction de la déformation, sur cette membrane, suivait une tendance opposée à celle observée sur la membrane « μm ». En effet, certes lors des premiers cycles (hystérésis) nous avons une diminution des modules d'Young, mais à partir du quatrième ou cinquième cycle, nous avons une augmentation des modules d'Young sur tous les échantillons, qu'ils soient greffés ou témoins.

En analysant les courbes des échantillons greffés et témoins entre eux, nous avons remarqué que sur les premiers cycles (du 1^{er} au 4^{ème} ou 5^{ème} cycle), les valeurs de modules d'Young sont en nette diminution pour les éprouvettes greffées UV 1 h - Oz 20 min. Le module d'Young est passé de 9.58 ± 0.2 MPa à 7.88 ± 0.35 MPa (2^{ème} cycle), puis les valeurs augmentent pour atteindre 10.51 ± 0.1 MPa au 8^{ème} cycle.

De plus, cette diminution des modules d'Young lors des premiers cycles a aussi été observée sur les échantillons greffés par voie thermique (1 h et 3 h) avec Oz 20 min, mais elle reste moins prononcée que pour le greffage UV 1 h - Oz 20 min. Les échantillons

greffés UV direct 1 h quant à eux suivent, à peu de choses près, la même variation que les échantillons témoins.

Pour résumer, suite à ces tests de traction avec charge-décharge sur les échantillons greffés et témoins des deux membranes, nous avons confirmé, une fois de plus, les différences de comportement de ces deux membranes en fibres PCL électrofilées en fonction de la morphologie de leurs structures. En effectuant ces tests, nous nous attendions à observer un effet de fatigue sur les performances des deux membranes, avec une décroissance continue des valeurs de modules d'Young.

La membrane « nm » (Fig. 68), du fait de sa structure lui conférant une très grande résistance à la traction, a montré que ce test a engendré une rigidification avec une augmentation des valeurs de modules d'Young. Cependant, une diminution brutale du module d'Young pour les éprouvettes greffées UV 1 h – Oz 20 min (du 1^{er} au 4^{ème} cycle) confirme l'effet du greffage UV 1 h avec Oz 20 min sur les caractéristiques de la membrane, puisque cette diminution a été la plus marquée sur cette série de greffage.

De plus, sur cette membrane « nm », l'augmentation des modules d'Young avec la déformation explique pourquoi cette membrane atteint le point de rupture autour de 246.75 ± 28.3 % de déformation. Dans le cas de la membrane « μm », nous avons plutôt eu une diminution des modules d'Young et cela explique aussi cette propriété de flexibilité de la membrane.

Néanmoins, la limite de la course de notre vérin (10 cm) et celle du capteur de déplacement (5 cm) ne permettent pas forcément d'aller très loin en déformation pour cette membrane, empêchant peut être de révéler un comportement autre que celui observé avec ce test limité à moins de 5 cm de déplacement.

4.3.1.3 Essai de relaxation

Les essais de relaxation ont été réalisés avec le même dispositif à la suite des essais de traction simple.

4.3.1.3.1 Principe

La relaxation est caractérisée par la décroissance de la contrainte en fonction du temps quand une déformation constante est appliquée à un matériau. Au-delà de la limite

d'élasticité, le polymère montre un comportement viscoplastique. Si le polymère entre dans cette zone, la déformation deviendra irréversible. L'énergie consommée pour cette déformation est non-récupérable.

4.3.1.3.2 Protocole d'essai

La déformation maximale de l'essai de traction est imposée sur l'éprouvette. Cette déformation est maintenue constante dans le temps et on mesure la diminution de la contrainte en fonction du temps pour atteindre un plateau au final (asymptote horizontale). Les essais sont réalisés de mêmes que les autres tests à température ambiante. Dans cette étude, les tests étant effectués sur deux membranes aux caractéristiques différentes, nous avons fait le choix de réaliser le test à partir de la limite de déformation max de la membrane « μm » autorisée par la course du vérin (550 %), et juste avant le point de rupture pour la membrane « nm ». Ainsi, les essais ne sont pas interrompus par des relaxations, celle-ci débute à la fin d'un essai de traction.

4.3.1.3.3 Résultats expérimentaux :

L'impact du traitement subi par les éprouvettes sur la relaxation (Témoins ; non traités, Oz 20 min, UV 1 h, Th 1 h et Th 3h / greffées ; G Th 1 h – Oz 20 min, G Th 3 h – Oz 20 min, G UV 1 h – Oz 20 min et G UV direct 1 h) a été étudié pour les deux membranes. 3 échantillons au minimum ont été testés à température ambiante. Nous avons commencé par réaliser un test de traction à 0.5 mm.s^{-1} , puis à une déformation donnée, nous avons laissé relaxer les contraintes sur 12 minutes (720 secondes). La Figure 69 présente un essai typique de relaxation réalisé sur des éprouvettes non traitées des deux membranes « μm » et « nm ».

A partir de la Figure 69, nous pouvons dire que même pour le comportement en relaxation, ces deux membranes laissent relaxer les contraintes différemment. Cela a été un résultat attendu, puisque les tests en traction simple ou avec cycles charges décharges ont déjà montré que le comportement mécaniques de ces deux membranes était bel et bien fonction de leur structure. La membrane « μm » non traitée semble retourner plus rapidement à l'état relaxé que la membrane « nm ».

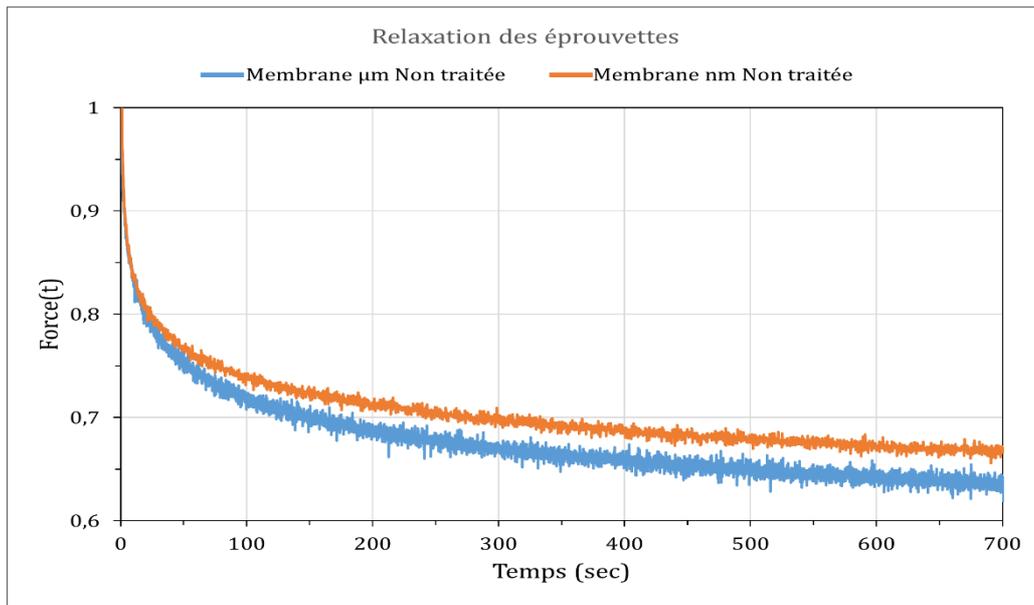


Figure 69 : Différence de relaxation des deux membranes testées.

En utilisant le logiciel MathCad, nous avons calculé les différents temps caractéristiques de relaxation : τ_1 qui est le temps de relaxation « court » et τ_2 qui est le temps de relaxation « long ». La Figure 71 représente la courbe expérimentale et la courbe théorique ajustée.

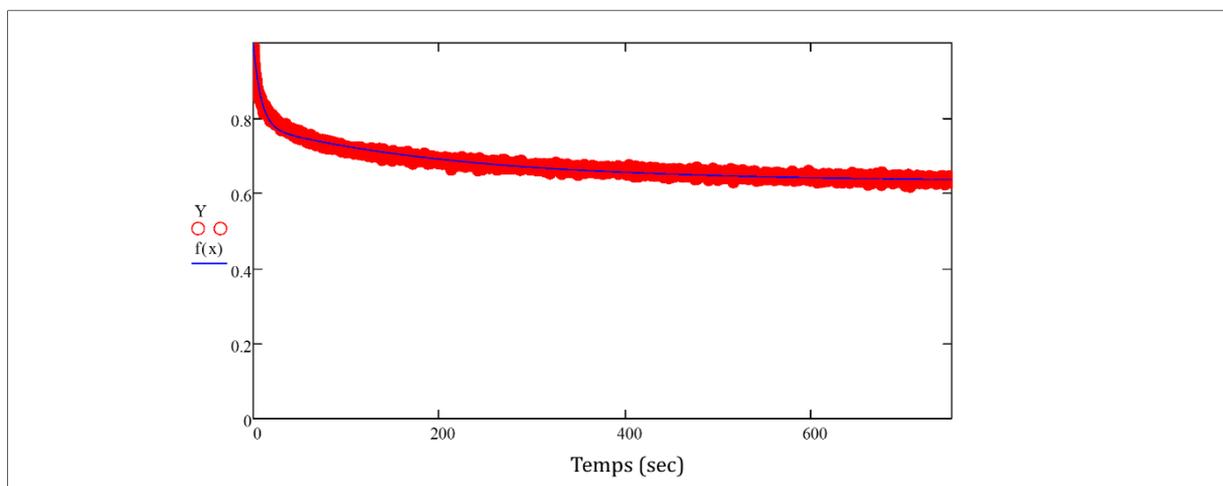


Figure 70 : Exemple de courbe obtenue ajustée avec MathCad : (rouge) expérimentale et (bleu) théorique.

Les courbes expérimentales obtenues sur les différents échantillons sont présentées dans la Figure 71. L'influence du procédé de greffage y est étudiée en détail.

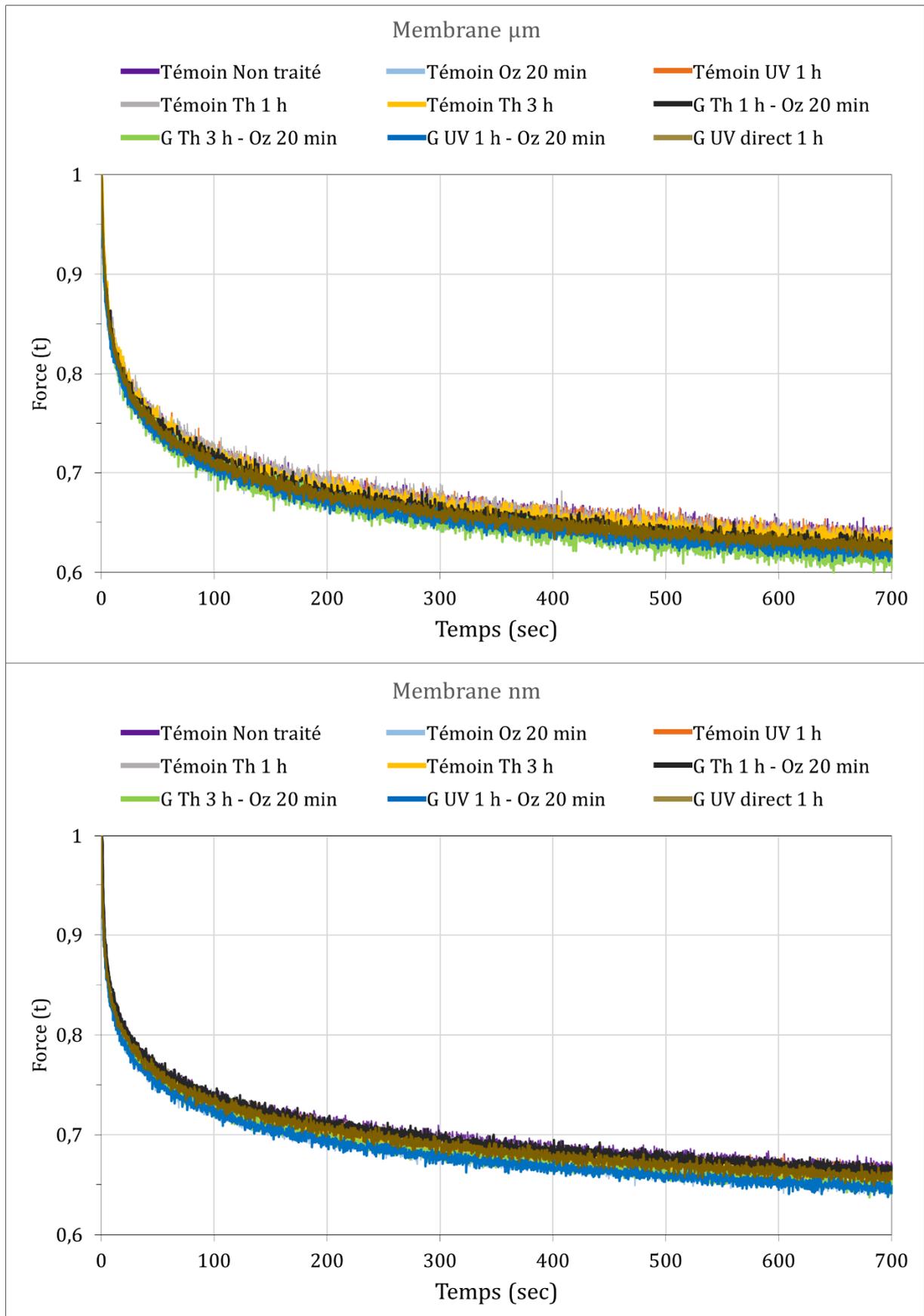


Figure 71 : Influence du traitement sur la relaxation des éprouvettes des membranes « μm » (en haut) et « nm » (en bas).

Les résultats du calcul des temps de relaxation, ont été effectués en utilisant le modèle de Prony décrit dans le paragraphe 2.5.1.5. Le calcul a été effectué en comparant les courbes théoriques et les courbes expérimentales. Le Tableau 24 présente les temps de relaxation pour chaque membrane et chaque condition de traitement.

Tableau 24 : Temps de relaxation pour chaque membrane et chaque condition de traitement.

Echantillons	Condition	Membrane	τ_1 (Court)	τ_2 (Long)	
Témoin	Non traité	μm	8.293 ± 0.9	221.577 ± 09	
		nm	7.249 ± 0.6	206.335 ± 25	
	Oz 20 min	μm	8.483 ± 0.3	268.192 ± 13	
		nm	9.351 ± 0.1	202.826 ± 17	
	UV 1 h	μm	8.354 ± 0.5	223.438 ± 19	
		nm	6.093 ± 0.4	197.848 ± 22	
	Th 1 h	μm	9.953 ± 0.2	251.164 ± 14	
		nm	6.396 ± 1.3	195.161 ± 09	
	Th 3 h	μm	9.540 ± 0.2	208.764 ± 10	
		nm	6.632 ± 0.8	196.452 ± 25	
	Greffé	Th 1 h - Oz 20 min	μm	8.416 ± 0.3	218.196 ± 16
			nm	7.628 ± 0.4	209.657 ± 08
Th 3 h - Oz 20 min		μm	7.515 ± 0.3	198.223 ± 16	
		nm	6.632 ± 0.8	196.452 ± 06	
UV 1 h - Oz 20 min		μm	5.628 ± 1.1	183.885 ± 34	
		nm	5.919 ± 0.9	193.656 ± 12	
UV direct 1 h		μm	8.683 ± 0.7	202.184 ± 18	
		nm	7.359 ± 0.2	197.460 ± 07	

En examinant le Tableau 24, il est possible d'observer que les deux membranes relaxent différemment. Cependant, il est difficile d'observer un impact des différents traitements sur les temps de relaxations. En effet, des variations peuvent être observées sur les différentes séries d'éprouvettes, mais il reste difficile de mettre en évidence des tendances claires surtout en comparant les deux membranes entre elles. Sur certaines conditions de traitement, une des membranes retournent plus vite à la relaxation par rapport au témoin non traité, pendant que sur l'autre membrane nous enregistrons un allongement des temps de relaxation. Cela est valable que ce soit pour les temps de relaxation courts (τ_1) mais aussi pour les temps longs (τ_2).

Par ailleurs, nous avons quand même observé que les temps de relaxation étaient raccourcis pour deux conditions de greffage, qui sont le greffage UV 1 h – Oz 20 min et le greffage Th 3 h – Oz 20 min. En effet, sur ces deux conditions de greffage, les deux temps de relaxation que ce soit pour la membrane « μm » ou « nm » ont diminué, nous laissant dire que ces éprouvettes retournaient plus rapidement à l'état relaxé que sur les autres conditions. Cette diminution est nettement plus marquée sur les éprouvettes greffées UV 1 h – Oz 20 min. Néanmoins, il est difficile de conclure que cette diminution des temps de relaxation est directement liée à l'association des différentes étapes de greffage ou à un processus en particulier (chaleur, ozonation, UV).

Le greffage UV direct 1 h n'a semble-t-il pas eu d'effet sur les temps de relaxation des éprouvettes, sur les deux membranes. Les temps de relaxation sur les éprouvettes greffées UV direct 1 h restent très proches de ceux des éprouvettes témoins non traitées.

Le choix des paramètres de ce test de relaxation, à savoir ; vitesse d'étirement, déformation à partir de laquelle le test de relaxation est débuté, a peut être conduit à ce qu'il n'y ait pas de mise en évidence d'éventuels effets des différents traitements subis par les éprouvettes sur les temps de relaxation. Il serait intéressant de reconduire ce test en comparant plusieurs vitesses de déplacement, mais aussi de débiter la relaxation à différentes déformation. Cela pourrait permettre de mieux mettre en évidence le caractère viscoélastique de ces membranes en fibres PCL électrofilées et ainsi révéler de possibles tendances sur les différences de comportement entre les deux membranes ou sur l'effet de chaque paramètre et/ou l'association de plusieurs paramètres sur le comportement en relaxation.

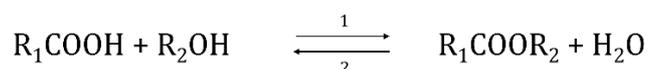
4.4 Etude de la dégradation ; évaluation des propriétés mécaniques :

La dégradation d'un polymère est la détérioration des propriétés due à un changement de la structure chimique [314]. Dans le cas des polyesters aliphatiques, comme le PCL dans notre cas, différents mécanismes de dégradation peuvent intervenir (mécanique, chimique et photodégradation).

L'avantage des polyesters réside dans le fait que leurs produits de dégradation sont, en règle générale, assimilés par l'organisme. Cela est d'autant plus vrai pour le PCL, dont les produits de dégradation sont éliminés par l'organisme sans accumulation [286-287]. Il en découle sa large application dans le biomédical. Il existe deux voies principales de dégradation des polyesters : l'hydrolyse et la dégradation enzymatique. L'hydrolyse étant le processus principal de dégradation, elle seule sera traitée dans cette étude.

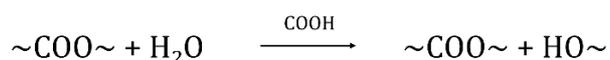
4.4.1 Principe de dégradation des polyesters :

La présence de la liaison ester dans le squelette du polymère permet, *via* son hydrolyse, la scission de la chaîne polymère. L'obtention d'un ester se fait lors de la réaction équilibrée entre un acide carboxylique et un alcool, produisant aussi une molécule d'eau, selon la formule suivante :



L'hydrolyse d'un ester conduit donc à la production d'un acide et d'un alcool (sens 2). Cette réaction peut être catalysée par des acides et des bases. Ainsi, l'acide carboxylique issu de la dégradation est capable d'accélérer l'hydrolyse de la liaison ester. Ce phénomène est appelé autocatalyse.

Dans le cas des polyesters, la réaction va aboutir à la scission de la chaîne en deux, l'une, ayant à son extrémité une fonction acide carboxylique et l'autre, une fonction alcool, comme le montre la formule suivante :



Par conséquent, la chaîne possédant le groupe acide va accélérer encore la réaction d'hydrolyse. L'hydrolyse d'un polyester suit toujours le même schéma. L'eau diffuse

préférentiellement dans les zones amorphes du matériau initiant sa dégradation par la scission aléatoire des liaisons esters. Une chute du poids moléculaire moyen M_w est alors observée. Les chaînes de polymère devenant, en raison de leur propre scission, de plus en plus petites, gagnent en mobilité et vont cristalliser [315].

Une fois que l'eau a pu pénétrer dans les cristaux, la dégradation s'accélère jusqu'à l'obtention de chaînes à petites M_w , qui pourront elles-mêmes diffuser à travers le matériau entraînant une perte de masse et un ralentissement de la vitesse de scission des liaisons esters [316], ce qui constitue le phénomène d'érosion. Il apparaît que pour les pièces de grande taille la dégradation est plus rapide en masse qu'en surface. Ce phénomène a lieu en raison de l'autocatalyse plus forte en masse qu'en surface.

4.4.2 Facteurs influençant la dégradation :

Ces facteurs peuvent être classés en deux catégories : les facteurs intrinsèques (type de polyester, sa M_w , etc.) et les facteurs extrinsèques (pH du milieu, température, etc.).

4.4.2.1 Facteurs intrinsèques :

Le type de polymère détermine la durée de dégradation. Le PCL se dégrade très lentement (~ 3 ans) [314], en raison notamment de sa grande hydrophobie, par rapport au PGA qui est le polyester qui se dégrade le plus rapidement (quelques semaines), en conséquence de la présence d'une liaison C-H jouxtant la liaison ester qui permet une accessibilité accrue de l'eau permettant la scission des chaînes. Le PLA, quant à lui, se dégrade moins vite que le PGA (de plusieurs mois à plusieurs années) car il y a un groupement CH_3 à proximité de la liaison ester ce qui réduit l'accessibilité de l'eau.

La composition a une influence très importante sur la vitesse de dégradation. De manière générale et à de rares exceptions près, les homopolymères ont une durée de dégradation plus longue que leurs copolymères associés.

La valeur de la M_w ou bien de la M_n est l'un des facteurs les plus importants. Par exemple, Pitt *et al.* (1981) [316] ont montré que des films de PLA de $M_n = 14,000$ g/mol se dégradent plus rapidement que ceux ayant une $M_n = 49,000$ g/mol (on passe en effet de 28 semaines pour les premiers à 60 semaines pour les seconds en terme de résorption totale).

La distribution des M_w joue un rôle majeur étant donné le caractère autocatalytique de la dégradation. Lorsqu'un polymère possède une M_w élevée et une distribution des M_w étroite, la résistance à la dégradation est plus forte que pour un même polymère dont la distribution est élargie [317]. En conclusion, plus la M_w est faible, plus la dégradation est rapide.

Le taux de cristallinité est très important puisque la dégradation des polyesters se produit préférentiellement dans les zones amorphes du matériau. Plus le taux de cristallinité est élevé, plus la dégradation est lente. Cependant, une recristallisation peut être observée suite à la plus grande mobilité des chaînes issues de la dégradation.

4.4.2.2 Facteurs extrinsèques :

La taille et la géométrie jouent des rôles prépondérants dans la dégradation des polyesters. Il apparaît que plus la taille est petite, plus la dégradation est lente, la dégradation en masse n'intervenant pas dans les géométries à faible taille. Ainsi des billes se dégradent plus vite que des fibres [318].

Le milieu va influencer sur la vitesse de dégradation de par son pH, sa force ionique, et sa concentration en sel. Le pH du milieu a une influence sur le taux de dégradation. Dans un milieu alcalin la dégradation du PCL est plus rapide que dans un environnement acide [285].

Une augmentation de la température va permettre, une plus grande mobilité des espèces chimiques et ainsi faciliter la diffusion des molécules d'eau, favorisant ainsi la dégradation.

4.4.3 Dégradation des échafaudages « μm » :

Une des caractéristiques les plus importantes lors de l'utilisation d'échafaudage biodégradables en implantation *in vivo* est qu'il doit persister dans un état robuste pendant un temps suffisant pour permettre la formation de nouveaux tissus, mais aussi finir, à terme, par se dégrader et être remplacé par ce tissu. Pour une mise en œuvre réussie dans des applications telles que les sutures chirurgicales, les systèmes d'administration de médicaments et les échafaudages d'ingénierie tissulaire, l'étude de la

dégradation par hydrolyse des échafaudages biodégradables est d'une importance cruciale.

Dans le but de caractériser le comportement des échafaudages pendant la dégradation, nous avons réalisé une étude sur l'évolution des propriétés mécaniques des échafaudages issus de la membrane « μm ». Cette étude a aussi pour but d'évaluer le temps nécessaire pour la perte des propriétés mécaniques. Les propriétés mécaniques ont été mesurées sur plusieurs semaines ; telles que l'évolution des modules d'Young, les contraintes Max, les temps de relaxation ainsi que la morphologie des fibres.

4.4.3.1 *Protocole expérimental :*

4.4.3.1.1 Préparation des échafaudages « μm » greffés polyNaSS:

Les mêmes éprouvettes H3 utilisées pour la partie caractérisation mécaniques ont été employées pour cette étude. A noter que, comme pour l'étude des propriétés intrinsèques du PCL (par DSC et SEC) ainsi que pour la caractérisation du greffage de polyNaSS par XPS, cette étude de dégradation ne concerne que la membrane « μm ».

Les éprouvettes H3 ont été découpées à partir de la membrane « μm », puis greffées avec du polyNaSS selon les conditions utilisées précédemment. Nous avons donc 4 séries d'éprouvettes greffées : 2 greffages par voie thermique pendant 1 h ou 3 h avec ozonation 20 min (G Th 1 – Oz 20 min et G Th 3 h – Oz 20 min), 2 greffage sous irradiations UV : avec ozonation 20 min (G UV 1 h – Oz 20 min) et un greffage directement sous UV (G UV direct 1 h). A la fin du processus de greffage, les éprouvettes ont été lavées pendant 48 h dans de l'eau distillée. Des éprouvettes non traitées ont été utilisées comme témoins. 3 éprouvettes ont été testées pour chaque condition.

Trois éprouvettes sont ensuite plongées dans un tube de 60 mL contenant différents milieux, qui est ensuite placé à 37 °C.

4.4.3.1.2 Milieux de dégradation :

Nous avons immergé les éprouvettes greffées et témoins dans 3 différents milieux :

- dH₂O
- NaCl 0.15 M
- PBS

Le milieu de dégradation est changé une fois par semaine.

Nous avons commencé par évaluer les propriétés mécaniques à court terme, dans du dH₂O (2, 4, 8 et 12 semaines), puis nous nous sommes concentré sur la dégradation des éprouvettes greffées UV 1 h – Oz 20 min (qui permet d'avoir le maximum taux de polyNaSS greffé et un angle de contact de 0 °), en étudiant la dégradation à plus long terme (12 et 24 semaines) dans du dH₂O, le PBS et le NaCl 0.15 M.

4.4.3.2 *Evaluation des propriétés mécaniques :*

4.4.3.2.1 Après dégradation dans du dH₂O de 2 à 12 semaines :

Des tests de traction ont été réalisés en suivant le protocole décrits plus haut. Ces essais ont été effectués à une vitesse de déplacement du vérin de 0.5 mm.s⁻¹. Les différentes courbes de contrainte-déformation obtenues pour les différents échantillons greffés et témoins sont enregistrées et le module d'élasticité, la contrainte et la déformation maximale sont déterminés.

A noter que, lors de ces tests de dégradation, nous avons négligé une éventuelle érosion de la surface pouvant engendrer une diminution de la section utile ou l'épaisseur des éprouvettes. Les valeurs d'épaisseur et de section des éprouvettes, utilisée pour le calcul des différentes caractéristiques mécaniques sont celles des éprouvettes témoins de la membrane « μm ».

La dégradation des éprouvettes de la membrane « μm » a été étudiée sur 12 semaines consécutives en analysant la variation propriétés mécaniques (modules d'Young, déformation Max et contrainte Max). Les résultats ainsi obtenus sont résumés dans le Tableau 25.

Commençons par analyser la variation des valeurs de modules d'Young sur les différents échantillons à différents temps de dégradation. La Figure 72 présente les résultats de la mesure des modules d'Young (E). Nous pouvons remarquer que la valeur des modules d'Young a tendance à diminuer en fonction du temps de dégradation. Cela dit, sur les échantillons témoins, la diminution est très légère, même après 12 semaines passées dans du dH₂O, les éprouvettes témoins présentent un module d'Young de 3.38 ± 0.57 MPa.

Tableau 25 : Propriétés mécaniques des éprouvettes « μm », greffées et témoin non traité, dégradées dans dH_2O à différents temps.

Dégradation dans dH_2O													
Temps de dégradation		2 semaines			4 semaines			8 semaines			12 semaines		
Condition		E (MPa)	Déformation Max (%)	Contrainte Max (MPa)	E (MPa)	Déformation Max (%)	Contrainte Max (MPa)	E (MPa)	Déformation Max (%)	Contrainte Max (MPa)	E (MPa)	Déformation Max (%)	Contrainte Max (MPa)
Témoins	Non traité	4.16 ± 0.22	> 550	1.76 ± 0.10	3.92 ± 0.19	> 550	1.59 ± 0.12	3.44 ± 0.08	> 550	1.75 ± 0.02	3.38 ± 0.57	> 550	1.61 ± 0.11
	G Th 1 h - Oz 20 min	3.66 ± 0.38	> 550	1.58 ± 0.05	2.79 ± 0.28	> 550	1.38 ± 0.29	2.50 ± 0.45	> 550	1.17 ± 0.06	1.97 ± 0.28	> 550	0.94 ± 0.29
Greffés	G Th 3 h - Oz 20 min	3.53 ± 0.23	> 550	1.54 ± 0.04	2.43 ± 0.33	> 550	1.33 ± 0.14	2.49 ± 0.04	> 550	1.05 ± 0.03	1.89 ± 0.09	> 550	0.59 ± 0.02
	G UV 1 h - Oz 20 min	3.80 ± 0.42	> 550	1.49 ± 0.13	2.96 ± 0.41	> 550	1.33 ± 0.05	0.54 ± 0.22	18.1 ± 7	0.73 ± 0.13	0.09 ± 0.02	9.9 ± 1.2	0.15 ± 0.01
	G UV direct 1 h	3.68 ± 0.24	> 550	1.81 ± 0.02	2.84 ± 0.15	> 550	1.48 ± 0.03	2.63 ± 0.15	> 550	1.19 ± 0.08	2.48 ± 0.15	> 550	1.06 ± 0.02

Cette valeur était attendue étant donné la dégradation très lente du PCL non traité [314]. Par ailleurs, lorsque nous nous intéressons aux échantillons greffés, nous pouvons observer que la dégradation est fonction du ou des processus de greffage. En effet, des différences en termes de perte des propriétés mécaniques peuvent être relevées. Les éprouvettes qui se dégradent le moins vite après les témoins sont les éprouvettes greffées UV direct 1 h. La diminution du module d'Young sur ces éprouvettes suit une décroissance que nous pouvons qualifier de stable en fonction du temps. Les éprouvettes greffées par voie thermique (G Th 1 h - Oz 20 min et G Th 3 h - Oz 20 min) ont à peu de choses près le même profil de dégradation.

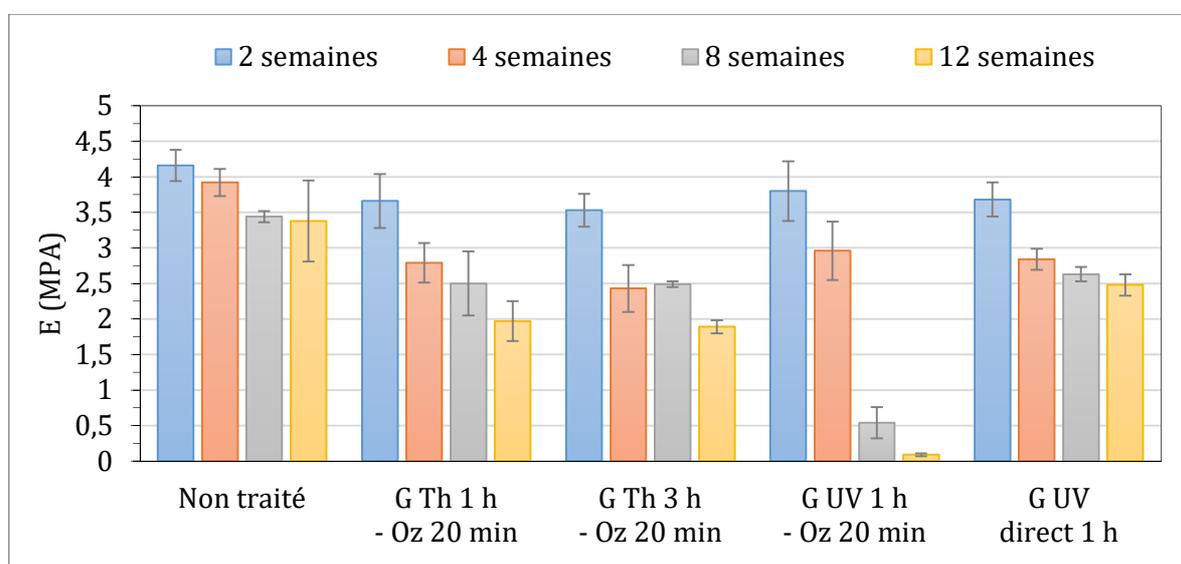


Figure 72 : Evolution du module d'Young au cours de la dégradation des éprouvettes « μm » dans du dH_2O .

Les éprouvettes greffées UV 1 h - Oz 20 min, présentent une chute brutale du module d'Young à partir de 8 semaines (0.54 ± 0.22 MPa), et cette valeur continue à chuter pour arriver à 0.09 ± 0.02 MPa après 12 semaines.

A partir de ces résultats, nous avons remarqué que les échantillons ayant subi une ozonation présentaient une diminution du module d'Young plus importantes que les échantillons non ozonés (G UV direct 1 h). De plus, sur les échantillons greffés UV 1 h - Oz 20 min, la diminution du module d'Young a été la plus importante, ceci étant certainement dû à l'association des irradiations UV et de l'ozonation, qui comme nous l'avons observé plus haut, induisait le plus de changement dans les propriétés mécaniques des éprouvettes.

Outre les valeurs de module d'Young, les valeurs de contraintes Max ont aussi subi des variations tout au long du test de dégradation de ces éprouvettes. Les valeurs de contraintes Max enregistrées pour les différents échantillons sont regroupées dans la Figure 73.

Pour commencer, sur les échantillons non traités, nous pouvons observer que la contrainte Max (enregistré à 550 % de déformation) semble ne pas subir de modification. Même après 12 semaines, la contrainte Max de ces échantillons reste à 1.61 ± 0.11 MPa, qui comparée à celle d'éprouvettes n'ayant pas subi de dégradation (1.81 ± 0.1 MPa) semble très proche. Sur les échantillons greffés, la contrainte Max semble diminuée en fonction du temps. Cependant, Les échantillons greffés Th 3 h – Oz 20 min et UV 1 h – Oz 20 min, présentent des valeurs de contraintes Max très faibles après 8 semaines.

A 8 et 12 semaines, les contraintes Max des échantillons greffés UV 1 h – Oz 20 min ont été enregistrées au point de rupture (Fig. 74). La contrainte Max des éprouvettes greffées Th 3 h – Oz 20 min à 12 semaines, même si elle est très faible (0.59 ± 0.02 MPa) a été enregistré à 550 % de déformation, sans qu'il n'y ait rupture des éprouvettes.

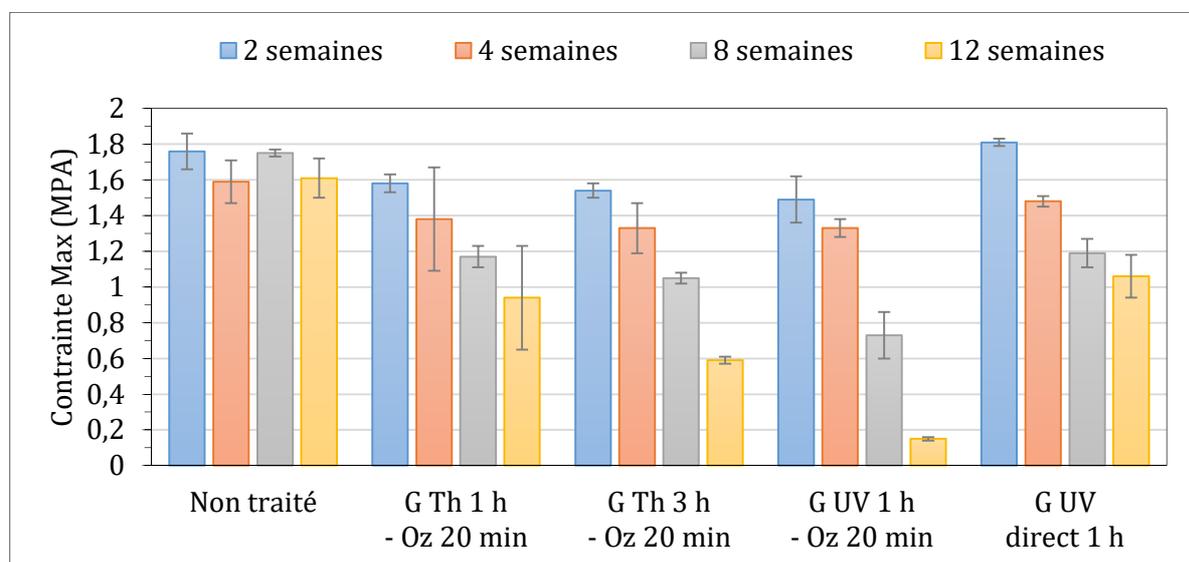


Figure 73 : Variation de la contrainte Max au cours de la dégradation des éprouvettes « μm » dans du dH_2O .

Pour finir, nous avons comparé les valeurs de déformation Max pour les différents échantillons. Ce qui est intéressant à noter, est que tous les échantillons ont présenté la même capacité à se déformer jusqu'à 550 %, à part les échantillons greffés UV 1 h – Oz 20

min, sur lesquels nous sommes arrivé à rupture des éprouvettes à $18.1 \pm 7 \%$ de déformation à 8 semaines, et à $9.9 \pm 11 \%$ après 12 semaines (Fig. 74).

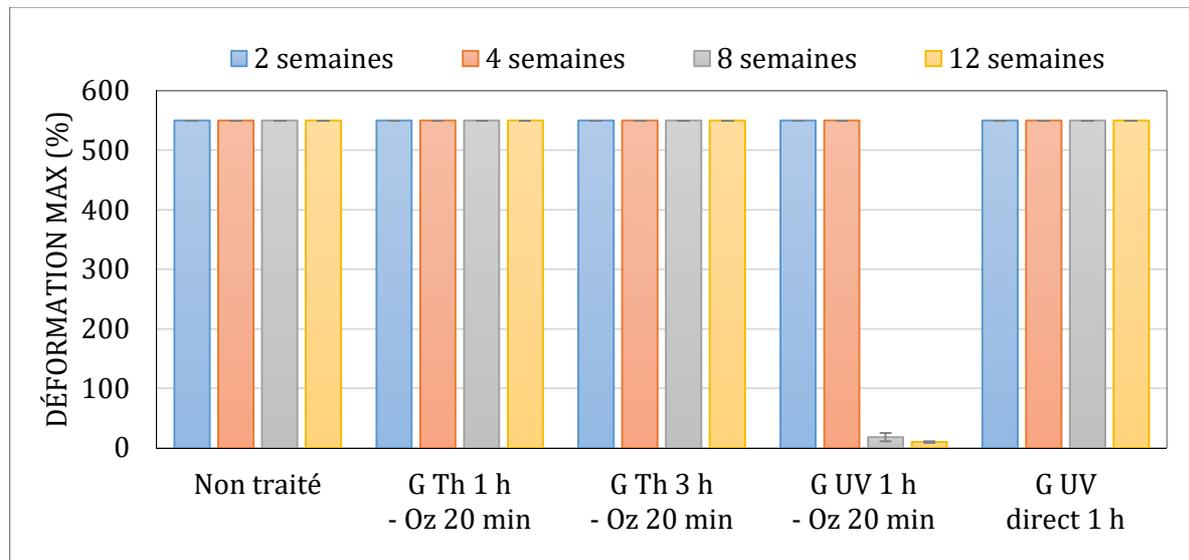


Figure 74 : Variation de la déformation Max au cours de la dégradation des éprouvettes « μm » dans du dH_2O .

En plus des essais de traction, nous avons aussi étudié la relaxation sur ces éprouvettes « μm » greffées et témoins au cours de la dégradation. Les temps de relaxation, calculés selon la même méthode utilisée dans le paragraphe 4.3.1.3, ont été regroupés dans le Tableau 26.

En comparant les temps de relaxation entre 2 et 12 semaines, nous avons remarqué un allongement des temps de relaxation, que ce soit les temps courts ou longs pour tous les échantillons témoins ou greffés. La plus importante augmentation des temps de relaxation a été observée à 12 semaines, pour les temps de relaxation longs (τ_2), des échantillons greffés par voie thermique avec comme plus haute valeur 356.068 ± 12 sec (G Th 3 h - Oz 20 min). Les temps de relaxation courts (τ_1) ont aussi augmenté entre 2 et 12 semaines, sauf pour les éprouvettes greffées UV direct 1 h.

Ainsi, nous assistons à une relaxation moins rapide que ce soit pendant les premières secondes ou même à des temps longs de l'essai lorsque les éprouvettes ont été laissées immergées dans du dH_2O à différents temps. Par ailleurs, les échantillons greffés par voie thermique présentent la relaxation la plus lente. A noter, que les temps de relaxation pour les échantillons greffés UV 1 h - Oz 20 min n'ont pas pu être enregistrés à 8 et 12 semaines à cause d'une rupture prématurée des éprouvettes.

Tableau 26 : Temps de relaxation pour les éprouvettes « μm » greffées et témoins en fonction du temps de dégradation, dans du dH_2O .

Temps de dégradation		2 semaines		4 semaines		8 semaines		12 semaines	
Echantillons	Condition	τ_1	τ_2	τ_1	τ_2	τ_1	τ_2	τ_1	τ_2
Témoins	Non traité	8.695 ± 0.6	188.988 ± 22	9.008 ± 0.3	227.208 ± 15	8.301 ± 0.4	210.543 ± 10	9.594 ± 0.6	215.28 ± 07
Greffés	Th 1 h - Oz 20 min	8.07 ± 0.5	234.932 ± 13	7.37 ± 0.2	207.893 ± 09	11.698 ± 0.4	254.679 ± 18	9.354 ± 0.2	356.068 ± 12
	Th 3 h - Oz 20 min	7.754 ± 0.6	213.07 ± 08	8.097 ± 0.1	213.028 ± 11	7.112 ± 0.1	203.11 ± 20	8.355 ± 0.5	302.252 ± 28
	UV 1 h - Oz 20 min	6.147 ± 0.6	197.87 ± 34	5.412 ± 0.9	190.045 ± 21	--	--	--	--
	UV direct 1 h	9.839 ± 1.1	214.014 ± 15	7.209 ± 1	205.235 ± 08	8.764 ± 0.2	211.162 ± 05	7.889 ± 0.3	222.112 ± 05

4.4.3.2.2 Après dégradation dans dH₂O, PBS et NaCl à 12 et 24 semaines :

L'évaluation des propriétés mécaniques des éprouvettes « μm », après dégradation à 12 et 24 semaines, traite exclusivement de celles greffées UV 1 h – Oz 20 min, comme présenté ci-dessous. Nous avons fait ce choix, pour étudier un peu plus en détails la dégradation sur ces éprouvettes qui semble-t-il se perdent leurs propriétés mécaniques au bout de 12 semaines (3 mois), lorsqu'elles sont laissées immergées dans dH₂O. Pour confirmer que cette dégradation est en rapport avec les traitements subis par les éprouvettes et non exclusivement au dH₂O qui pourrait accélérer le processus d'hydrolyse, nous avons conduit un test de dégradation dans 3 milieux différents : dH₂O, PBS et NaCl 0.15 m (pour simuler les fluides biologiques).

Nous avons commencé par préparer des éprouvettes de la membrane « μm », que nous avons greffé avec polyNaSS sous irradiation UV, avec ozonation préalable des échantillons. Comme dans le cas de la dégradation entre 2 et 12 semaines, trois éprouvettes sont plongées dans un tube contenant les différents milieux, qui est ensuite placé à 37 °C. Des éprouvettes non traitées ont été utilisées comme témoins.

Après chaque temps d'incubation (12 et 24 semaines), nous avons évalué les propriétés mécaniques des éprouvettes en suivant le même protocole décrit plus haut. L'évaluation des propriétés mécaniques (modules d'Young, déformation Max et contrainte Max) a été réalisée, et les résultats ainsi obtenus sont résumés dans le Tableau 27.

Tableau 27 : Propriétés mécaniques des éprouvettes « μm » témoins et greffées UV 1 h – Oz 20 min, au cours de la dégradation dans dH₂O, PBS et NaCl 0.15 M.

Temps (semaines)		12			24		
		E (MPa)	Déformation Max (%)	Contrainte Max (MPa)	E (MPa)	Déformation Max (%)	Contrainte Max (MPa)
Témoins	dH ₂ O	3.44 ± 0.08	> 550	1.75 ± 0.02	3.38 ± 0.57	> 550	1.61 ± 0.11
	PBS	3.55 ± 0.08	> 550	1.54 ± 0.01	3.6 ± 0.3	> 550	1.46 ± 0.05
	NaCl 0,15 M	3.68 ± 0.55	> 550	1.54 ± 0.10	3.43 ± 0.23	> 550	1.48 ± 0.14
G UV 1 h - Oz 20 min	dH ₂ O	0.54 ± 0.22	18.1 ± 7	0.73 ± 0.13	0.09 ± 0.02	9.9 ± 0.1	0.15 ± 0.01
	PBS	3.46 ± 0.63	> 550	0.9 ± 0.04	0.42 ± 0.28	10.8 ± 0.9	0.56 ± 0.19
	NaCl 0,15 M	3.32 ± 1.03	> 550	1.24 ± 0.11	0.18 ± 0.11	8.5 ± 0.7	0,19 ± 0.09

L'évolution de ces propriétés mécaniques, est présentée dans la Figure 75. En commençant par analyser les résultats pour les éprouvettes témoins non traitées, nous n'avons pas relevé de différence entre les différents milieux de dégradation, que ce soit à 12 ou 24 semaines, et cela pour les trois propriétés étudiées dans ces essai de traction.

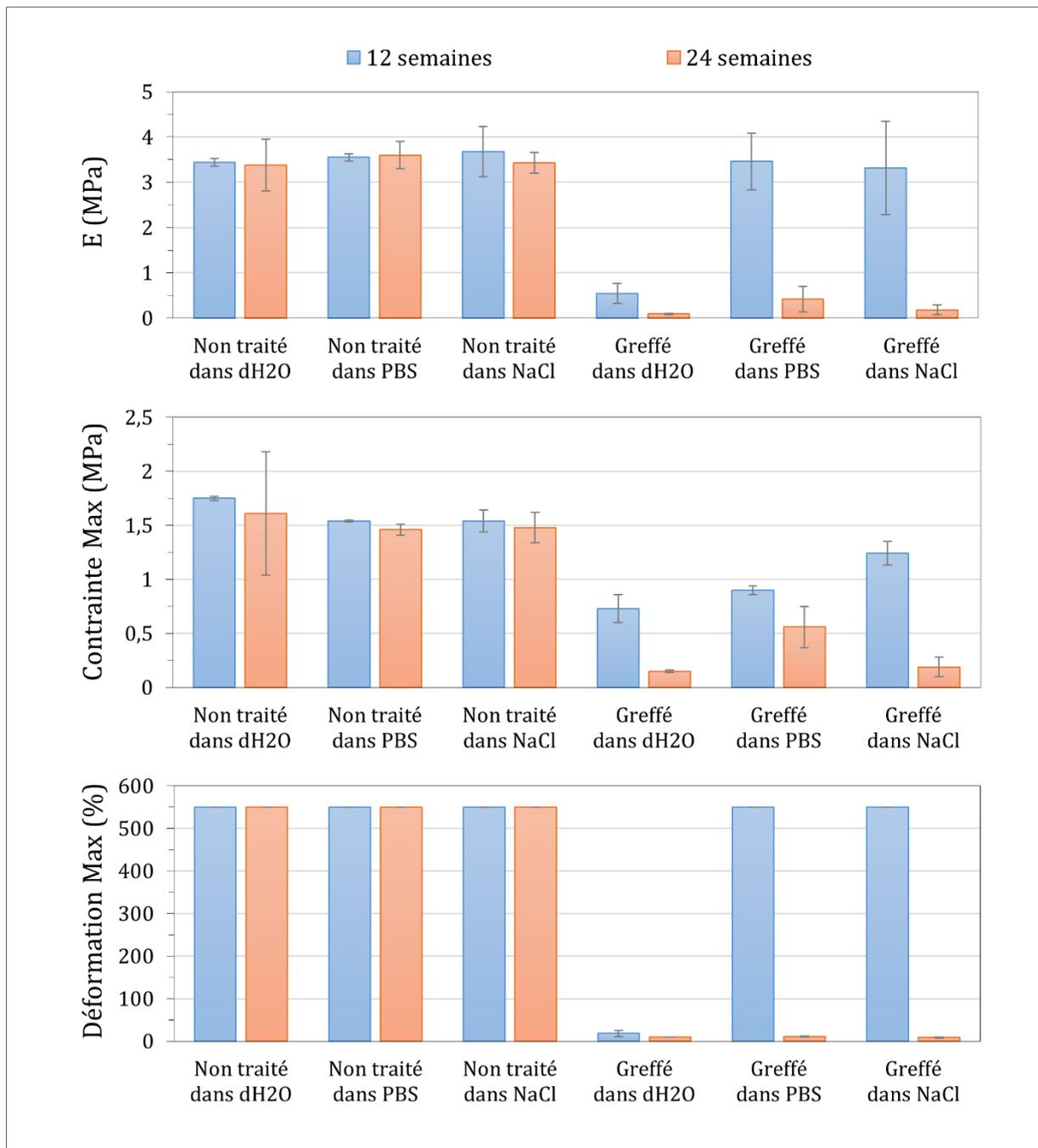


Figure 75 : Variation des propriétés mécaniques des éprouvettes « μm » témoins et greffées UV 1 h - Oz 20 min, au cours de la dégradation dans dH₂O, PBS et NaCl.

Sur les échantillons greffés, nous avons noté des différences en fonction du milieu de dégradation. En effet, pour les modules d'Young, nous avons observé que les éprouvettes laissées dans du PBS ou NaCl 0.15 M présentaient, à 12 semaines, des modules d'Young nettement supérieurs à celles laissées dans dH₂O. Pareillement, lorsque nous regardons ces modules à 24 semaines, ils sont plus importants pour ces éprouvettes laissées dans un milieu autre que dH₂O, même si il y a eu une diminution très importante sur l'ensemble de ces éprouvettes greffées.

De même, pour les contraintes Max, les éprouvettes laissées dans PBS et NaCl 0.15 M présentent une plus grande résistance à la traction. Il n'a pas eu de rupture de ces deux séries d'éprouvettes après 12 semaines de dégradation, et les valeurs de contraintes Max sont de ce fait plus hautes que celles dans dH₂O (qui ont rompu prématurément à 12 semaines). Ce qui d'autant plus intéressant est que, même si ces éprouvettes laissées dans PBS et NaCl pendant 24 semaines ont subi une rupture à des déformations plus ou moins égales avec celles laissées dans dH₂O, la contrainte Max enregistrée au point de rupture est supérieure pour ces deux séries d'éprouvettes.

Afin de comprendre ces différences, nous avons analysé des micrographies obtenues sous MEB, pour ces trois séries d'éprouvettes greffées UV 1 h - Oz 20 min à 12 et 24 semaines de dégradation. La Figure 76 regroupe ces micrographies MEB prises avant les tests de traction à 12 et 24 semaines. Les flèches marquent des points où les fibres ont rompu. Ces micrographies permettent de corréler les résultats sur les propriétés mécaniques avec la morphologie des fibres.

En effet, sur les échantillons laissés dans du dH₂O, des ruptures individuelles des fibres ont été observées au bout de 12 semaines. Le nombre de fibres rompues a augmenté de façon considérable après 24 semaines de dégradation, et cela a été observé même sur des fibres situées dans des plans profonds de la membrane. Contrairement à cette série d'éprouvettes, aucune rupture des fibres n'a pu être décelée sur les échantillons laissés dans du PBS et NaCl 0.15 M à 12 semaines, ce qui explique que ces éprouvettes présentent des propriétés mécaniques nettement supérieures à celles laissées dans dH₂O, en l'occurrence une déformation qui va jusqu'à plus de 550 %.

Après 24 semaines de dégradation, quelques fibres rompues ont été dénombrées sur les éprouvettes greffées laissées dans du NaCl 0.15 M. Etrangement, sur les éprouvettes

laissées dans du PBS après 24 semaines, nous n'avons pas relevé de rupture des fibres, même si ces éprouvettes ont cédé, sous traction lors du test, après 10.8 ± 0.9 % de déformation. Il serait intéressant d'observer la morphologie de ces fibres avec un microscope pouvant descendre à une résolution de l'ordre du nanomètre, afin de pouvoir observer d'éventuelles fêlures sur les fibres, ce qui expliquerait l'amorçage de leur rupture très tôt lors de la caractérisation mécanique.

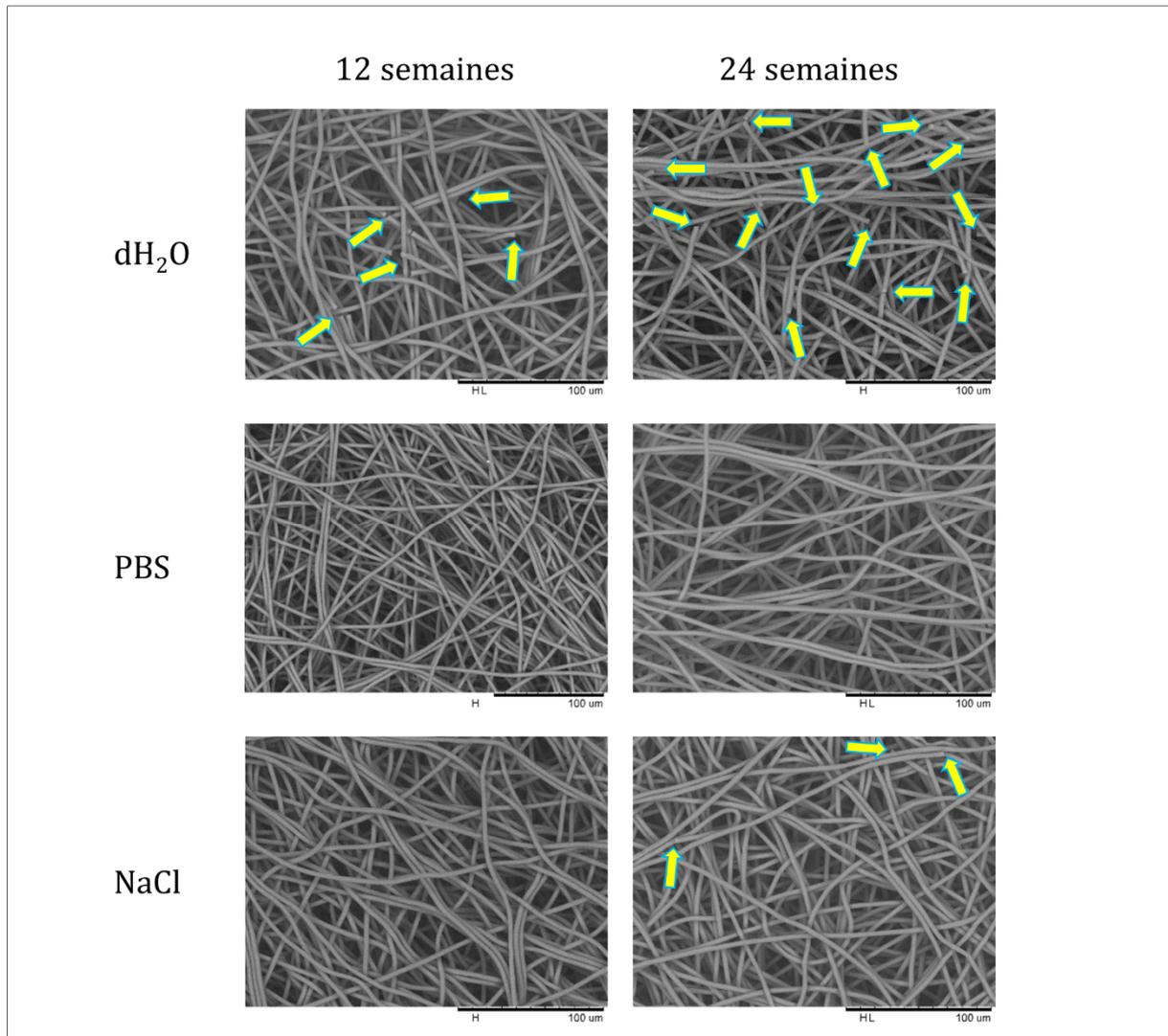


Figure 76 : Micrographies sous MEB des éprouvettes greffées UV 1 h - Oz 20 min lors du test de dégradation, dans différents milieux.

Ces résultats suggèrent que la dégradation de ces éprouvettes greffées UV 1 h - Oz 20 min est plus raide dans dH₂O que dans le NaCl, puis dans le PBS. Néanmoins, quel que soit le milieu de dégradation, cette condition de greffage (G UV 1 h - Oz 20 min), qui permet d'avoir le plus haut taux de greffage associé à un angle de contact de 0 °, se dégradent

complètement et perdent la quasi-totalité de leurs propriétés mécaniques au bout de 24 semaines (6 mois).

Nous avons aussi calculé les temps de relaxation de ces éprouvettes dégradées à 12 et 24 semaines, et les résultats sont présentés dans le Tableau 28. Comme pour les éprouvettes greffées et laissées dans dH₂O à 24 semaines, nous n'avons pas enregistré les temps de dégradation des éprouvettes laissées dans PBS et NaCl 0.15, suite à la rupture prématurée des éprouvettes. Notons tout de même, que les temps de relaxation à 12 semaines pour les éprouvettes immergées dans PBS et NaCl 0.15 M à 12 semaines ont été allongés.

Tableau 28 : Temps de relaxation pour les éprouvettes « μm » témoins et greffées UV 1 h - Oz 20 min, au cours de la dégradation dans dH₂O, PBS et NaCl.

		12 semaines		24 semaines	
Echantillons	Condition	τ_1	τ_2	τ_1	τ_2
Témoins	dH ₂ O	8.301 ± 0.4	210.543 ± 10	9.594 ± 0.6	215.28 ± 07
	PBS	9.279 ± 0.1	248.415 ± 32	11.051 ± 0.2	264.186 ± 06
	NaCl 0.15 M	10.035 ± 0.2	260.362 ± 07	12.825 ± 0.1	282.362 ± 15
G UV 1 h - Oz 20 min	dH ₂ O	--	--	--	--
	PBS	9.762 ± 0.4	316.353 ± 08	--	--
	NaCl 0.15 M	9.708 ± 0.5	266.974 ± 11	--	--

Le calcul des temps de relaxation dans ces conditions de test, n'a pas permis de mettre en évidence le caractère viscoélastique de cette membrane « μm » même après plusieurs semaines de dégradation, puisque nous n'avons pas pu noter de différences significatives ou des tendances claires sur les différentes conditions de traitement testées.

Lovdal. A *et al.* (2014) [319] ont démontré que les propriétés mécaniques du PCL non modifié de poids moléculaire relativement élevé étaient meilleures même lorsqu'il était hydraté. Ils ont démontré que le PCL électrofilé incubé à 37 °C dans du milieu, ou PBS pendant 3 à 16 semaines, n'a pas conduit à une détérioration de ses propriétés mécaniques en fonction du temps d'incubation. Au cours de cette période, il n'y a eu aucune dégradation en vrac et peut-être même aucune dégradation en surface. Cependant, à un pH de 12, la dégradation accélérée a montré une diminution linéaire du module d'élasticité et de la limite d'élasticité, en fonction du temps de dégradation. La

polydispersité dans cette étude suggérait une scission non aléatoire des liaisons ester. Des observations MEB ont montré un amincissement des fibres indiquant que la dégradation en surface et en vrac s'étaient produites. L'évaluation de la dégradation accélérée dans cette étude a suggéré qu'il était possible de prédire les propriétés mécaniques d'un échafaudage pendant la dégradation.

Dans notre étude, la fonctionnalisation de la surface de ces échafaudages en fibres PCL électrofilées change la façon dont ces échafaudages se dégradent. En effet, le polymère polyNaSS greffé à la surface des fibres confère un caractère d'hydrophilie plus ou moins prononcé aux fibres PCL, en fonction de la technique de greffage utilisée. De plus, cette fonctionnalisation fait appel à diverses étapes, qu'elles soient physiques ou chimiques, qui même sans modifier le caractère hydrophobe prononcé du PCL pur, modifient les propriétés mécaniques de ces fibres en PCL électrofilées. Tout cela, fait que l'hydrolyse du PCL est accélérée dans notre cas, puisque nous avons associé une hydrophilie de la surface, augmentant la pénétration des molécules d'eau au travers du réseau des échafaudages, avec plusieurs étapes de traitements altérant plus ou moins les propriétés mécaniques.

Cela dit, nous avons démontré qu'avec notre technique de greffage, nous pouvions contrôler la vitesse de dégradation de ces échafaudages, ce qui pourrait servir, par exemple, au développement d'échafaudages en fibres PCL qui se dégradent très vite. Cependant, cela doit être conforté par une étude de la dégradation *in vitro* en associant des cellules avec ces échafaudages, et plus important encore, étudier la dégradation *in vivo* dans un modèle animal en ciblant les propriétés mécaniques voulues du tissu à remplacer.

Pour les raisons citées plus haut, cette étude de la dégradation n'a été réalisée que sur un seul type de membrane, en l'occurrence la membrane « μm ». Il conviendrait donc de mener une autre étude plus représentative en incluant aussi la membrane « nm ». En effet, nous avons bien vu que ces deux membranes avaient des comportements mécaniques bien différents, en fonction de leurs structures respectives. Afin de bien assimiler les différences entre ces deux membranes, surtout en termes de dégradation, suite aux différentes étapes subies au cours du processus de fonctionnalisation (traitements physico-chimiques), cette étude devrait être conduite sur toutes les conditions de greffage, ainsi que sur les témoins traités (sous chaleur, ozone ou irradiations UV) et ainsi associer des propriétés mécaniques données avec chaque étape ou chaque membrane.

4.5 Conclusion :

L'électrofilage (ou électrospinning) est une technique nouvelle au laboratoire qui a été développée durant mes deux dernières années de thèse. Cette étude expérimentale de l'électrofilage a permis de mettre au point des bases pour la déposition de fibres polymères électrofilées, et a démontré qu'il était désormais possible de fabriquer, à l'aide de ce dispositif d'électrofilage fait-maison, de manière reproductible, des membranes électrofilées avec différentes microstructures et des diamètres de fibres variés.

L'objectif de cette partie de l'étude était de démontrer la faisabilité du greffage covalent, sous irradiation UV, d'un polymère bioactif sur des échafaudages en fibre PCL électrofilées. Plusieurs techniques de caractérisation de surface ont confirmé que le greffage covalent de polyNaSS à la surface des fibres électrofilées a été un succès.

Des analyses des propriétés intrinsèques du matériau constituant les échafaudages, ont démontré que les différentes étapes du processus de greffage ne modifiaient pas, ou ne modifient que peu, les propriétés intrinsèques du PCL, quelle que soit la méthode de greffage utilisée.

Néanmoins, l'amélioration de la réponse biologique ne doit pas se faire au détriment des propriétés mécaniques et de l'intégrité structurelle des échafaudages. Une étude mécanique a été réalisée, à l'aide d'un banc d'essais développé au laboratoire, pour caractériser ces échafaudages et évaluer l'impact des différentes étapes de fonctionnalisation sur les propriétés mécaniques, soit directement après le processus de fonctionnalisation, soit après incubation dans différents milieux de dégradation.

De manière générale, le savoir-faire acquis dans cette partie, sera utilisé dans la suite des travaux afin de développer un échafaudage complexe pour cibler une application précise ; à savoir l'ingénierie tissulaire du parodonte.

Développement d'un échafaudage bicouche pour la régénération tissulaire/osseuse guidée du parodonte

Dans ce cinquième chapitre, sont décrits, les travaux que nous avons réalisés sur le développement d'un échafaudage « bicouche » en fibres PCL électrofilées. Cet échafaudage est constitué par les deux échafaudages « μm » et « nm » décrits dans le 4^{ème} chapitre, et est conçu pour une application en régénération tissulaire guidée (RTG) et/ou régénération osseuse guidée (ROG) du parodonte. Les travaux incluent ; l'établissement des conditions de déposition de cet échafaudage bicouche ainsi que sa fonctionnalisation par le greffage d'un polymère bioactif (polyNaSS) et la caractérisation des propriétés mécaniques. Une étude de la réponse biologique a été réalisée pour évaluer l'influence du greffage de polyNaSS sur l'adhésion, l'étalement, la morphologie et la prolifération de fibroblastes. Une appréciation, de l'effet de la microstructure des deux couches constituant cet échafaudage sur le comportement cellulaire, a aussi été effectuée.

A la suite d'un traumatisme ou d'une maladie infectieuse telle que la parodontite⁹ avancée, le volume osseux est réduit. Les pertes osseuses verticales et/ou horizontales chez les patients partiellement ou totalement édentés constituent un défi majeur pour la réhabilitation en raison des limitations anatomiques et des difficultés techniques [320].

Dans les cas d'édentement¹⁰, l'utilisation d'implants ostéointégrés est devenue une modalité de traitement de plus en plus courante pour le remplacement des dents manquantes. Cependant, l'une des conditions nécessaires pour un bon pronostic à long terme des implants est un volume suffisant d'os sain du site receveur.

Différentes techniques et biomatériaux ont été développés pour la reconstruction des défauts des crêtes alvéolaires afin de permettre la mise en place immédiate ou différée d'implants dentaires. Nous parlons alors de la régénération tissulaire guidée (RTG) qui est une intervention chirurgicale qui consiste à éliminer, après élévation d'un lambeau muco-périosté, le tissu de granulation gingival et osseux, en curetage radiculaire et osseux et surfaçage cémento-dentinaire. Une membrane résorbable ou non-résorbable est ensuite positionnée sur le défaut parodontal, et le lambeau est suturé en position initiale. Sous la membrane se forme alors un caillot sanguin. Lorsque la cicatrisation progresse normalement, les structures parodontales comme le ligament parodontal (ou desmodonte), os alvéolaire et le ciment se régénèrent. La croissance en profondeur de l'épithélium est contrecarrée par la présence de la membrane. Celle-ci disparaît au bout de quelques mois (dans le cas d'une membrane résorbable) ou déposée au bout de quelques semaines (dans le cas d'une membrane non-résorbable).

Nous avons aussi la régénération osseuse guidée (ROG), technique dérivée de la RTG qui est également une intervention chirurgicale qui vise à placer un greffon osseux sur le site souhaité dû à une quantité ou qualité insuffisante d'os et de l'isoler des cellules indésirables (cellules épithéliales et tissu conjonctif) par une membrane et permettre ainsi la préservation du site, du caillot sanguin et la régénération osseuse.

⁹ La parodontite est une maladie d'origine bactérienne, qui survient le plus souvent lorsque les mécanismes immunitaires sont affaiblis. Elle débute généralement par une inflammation de la gencive (gingivite) qui s'étend progressivement vers le tissu osseux, en formant des « poches » infectées entre la gencive et la dent. En l'absence de traitement, la parodontite peut entraîner une destruction de l'os et un déchaussement, voire une perte des dents.

¹⁰ L'édentement est une pathologie correspondant à l'absence de dents dans une bouche adulte. L'édentement commence lorsqu'au moins une dent manque à la denture d'un adulte, hors dent de sagesse.

Les réhabilitations implanto-prothétiques se heurtent à des impératifs esthétiques, phonétiques et fonctionnels bien particuliers. Répondre à ces impératifs, en présence d'une résorption osseuse, implique la reconstruction d'un volume crestal suffisant et adéquat. Les techniques chirurgicales et implantaire ont évolué pour mieux répondre aux exigences esthétiques et fonctionnelles de la dentisterie actuelle, et ces techniques de régénération tissulaire et osseuse guidées (RTG/ROG) ont été appliquées avec succès dans le traitement des lésions parodontales et ont permis de former du nouvel os [321].

C'est ainsi que différents types de membranes ont été mis en place, les membranes non résorbables, mais également les membranes résorbables qui ont montré lors de nombreuses expérimentations de bien meilleurs résultats que les membranes non résorbables.

L'apparition de membranes résorbables, fiables, a permis d'en étendre les indications, évitant les risques d'exposition prématurée et leur dépose, toujours difficile. Parmi les résorbables. Bien que ces membranes soient résorbables, il a été démontré que les membranes de collagène empêchent la croissance épithéliale le long des surfaces des racines pendant les premières phases de la cicatrisation et permettent ainsi de laisser le temps aux cellules indispensables à la régénération (comme les cellules du ligament parodontal) de coloniser les surfaces désirées [320].

Afin de mieux comprendre l'évolution que ces matériaux, il convient d'explicitier les principes des techniques RTG/ROG et de survoler l'état actuel des techniques thérapeutiques se basant sur la technique d'électrofilage.

Ces techniques utilisent des membranes comme barrières mécaniques pour créer un espace autour des défauts, ce qui permet à la régénération osseuse de se produire en l'absence de compétition pour l'espace par les tissus conjonctifs environnants. Les membranes utilisées dans le traitement par RTG/ROG doivent être biocompatibles, avoir un profil de dégradation approprié, des propriétés mécaniques et physiques adéquates et une résistance suffisante et durable [197].

Une complication récurrente liée aux membranes non résorbables est le risque d'exposition de la membrane, qui entraîne l'échec de la greffe et une infection récurrente. Les membranes non résorbables peuvent interrompre l'apport sanguin adéquat à la

gencive, provoquant une ischémie, suivie d'une déhiscence des tissus mous et d'une exposition ultérieure de la membrane.

De plus, les membranes non résorbables nécessitent une seconde intervention chirurgicale pour leur retrait, ce qui augmente le risque d'infection et la morbidité du site [322]. Plusieurs études n'ont fait état d'aucune différence significative entre le traitement avec les membranes de RTG résorbables et non résorbables. Cependant, les membranes résorbables offrent de nombreux avantages par rapport aux matériaux non résorbables, à savoir une réduction de la cicatrisation post-opératoire et de la morbidité du site, et puisqu'une seule chirurgie est nécessaire, une meilleure cicatrisation des tissus mous, et une probabilité réduite d'infections récurrentes [323]. Les avantages et inconvénients des deux classes de membranes sont résumés dans le Tableau 29.

Tableau 29 : Avantages et inconvénients des membranes RTG/ROG résorbables et non résorbables.

	Avantages	Inconvénients
Non résorbable	Stabilité Biocompatibilité Résultats plus prévisibles	La chirurgie supplémentaire pour le retrait de la membrane est la cause de potentielles infections et la morbidité du site L'exposition de la membrane est une complication récurrente conduisant à un échec
Résorbable	Réduction du temps de cicatrisation post-opératoire et la morbidité du site (une seule chirurgie nécessaire) La résorption rapide réduit la probabilité d'infections récurrentes Taux de complications réduit / non résorbables	Ont généralement de faibles propriétés mécaniques Des cas d'inflammations des tissus adjacents ont été reportés

Le collagène est le biomatériau naturel le plus couramment utilisé pour les applications de RTG. Cependant, il existe certaines limites, comme la perte d'entretien de l'espace dans des conditions physiologiques, les risques de transmission de maladies aux humains par le collagène d'origine animale et les coûts élevés [324]. Pour surmonter ces limites, des membranes polymères RTG ont été développées. Le PLA, le PGA et leurs copolymères ont été largement considérés pour les applications en membranes RTG. Cependant,

l'accumulation d'acide pendant la dégradation peut réduire considérablement le pH, ce qui entraîne une inflammation aseptique chronique [128,325].

Par rapport au PLA et au PGA, la dégradation du PCL ne produit pas d'environnement acide local. Ainsi, en raison de son coût relativement faible et de sa résistance mécanique élevée, le PCL est un polymère biomédical très intéressant. Cependant, seules quelques études ont examiné les membranes RTG à base de PCL [328-328]. Comme expliqué plus haut, le PCL se dégrade très lentement et son temps d'absorption *in vivo* est d'environ 3 ans [314], ce qui est trop long pour une application dans les traitements par RTG/ROG. De plus, sa faible hydrophilie réduit l'adhérence cellulaire. Par conséquent, le PCL doit être mélangé ou copolymérisé avec d'autres polymères.

Le rapport surface/volume intrinsèquement élevé des échafaudages électrofilés peut améliorer l'attachement des cellules, ainsi que l'administration locale soutenue et contrôlée de médicaments. La taille moyenne des pores des membranes en fibres électrofilées est d'environ 4 à 6 μm . Le diamètre des cellules eucaryotes varie de 10 à 100 μm . Il est donc difficile pour les fibroblastes gingivaux et les cellules parodontales de passer à travers une membrane électrofilée. Ces caractéristiques structurelles rendent les membranes en fibres électrofilées très appropriées pour une utilisation comme membrane RTG/ROG. Nous pouvons dans ce cas dire que notre stratégie de fonctionnaliser des membranes en fibres PCL électrofilées par le greffage covalent de polymère bioactifs, trouve donc en toute logique, une utilité évidente.

Dans cette étude, nous avons décidé de développer un échafaudage bicouche, en combinant les deux membranes que nous avons préalablement exposée dans le chapitre (IV). Notre approche dans cette partie de l'étude, s'appuie sur les caractéristiques que doit posséder une membrane destinée pour des applications RTG/ROG [197]. Il existe déjà dans le commerce deux membranes bicouches ; Bio-Gide [®], Hypro-sorb [®], réalisées à partir de collagène pur (type I et/ou III) et possédant une structure en bicouche. Cependant, ces membranes se heurtent aux limitations concernant l'utilisation du collagène.

Le concept est assez simple, il s'agit de combiner les deux membranes « μm » et « nm » en une seule membrane bicouche, puis la fonctionnaliser par greffage de polyNaSS afin d'optimiser la réponse cellulaire, en vue d'une application en RTG/ROG.

5.1 Elaboration d'un échafaudage en fibres PCL électrofilées « bicouche » :

Cet échafaudage devra restaurer les tissus endommagés, aider à les maintenir en place et effacer les effets destructeurs de la parodontite ou d'une lésion traumatique, accélérer la cicatrisation et stabiliser la lésion parodontale. La structure en bicouche (Fig. 77) de cet échafaudage est pensée comme suit :

- ✓ *Une surface poreuse ou rugueuse* : face à l'os : faite avec la membrane « μm », avec une taille des pores assez large. Elle doit permettre la stabilisation du caillot sanguin et la croissance en profondeur des cellules osseuses.

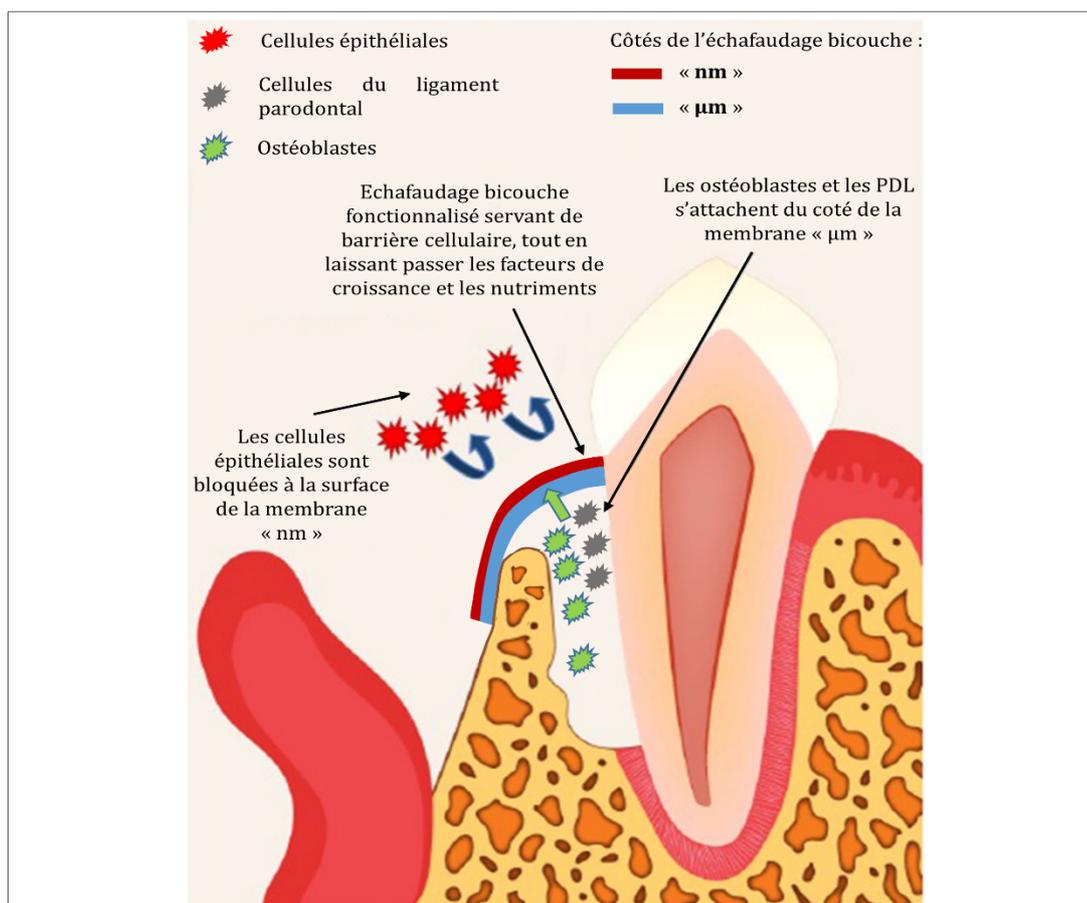


Figure 77 : Représentation schématique de l'échafaudage bicouche fonctionnalisé¹¹.

¹¹ Le principe est que cet échafaudage est positionné au-dessus du défaut, lors d'une procédure de RTG/ROG, pour empêcher les cellules fibroblastiques de coloniser le défaut pendant la cicatrisation, tout en permettant aux cellules osseuses de migrer et de combler le défaut, entraînant ainsi une régénération osseuse directe.

- ✓ *Une surface dense, lisse et moins poreuse* : face aux tissus mous : faite avec la membrane « nm » empêchant la croissance des tissu fibreux en profondeur. Elle doit être occlusive aux cellules épithéliales et conjonctives, mais en même temps perméable aux facteurs de croissance. Elle doit se caractériser par une faible antigénicité, une excellente biocompatibilité, une grande résistance au déchirement et une durée de résorption prolongée.

Cet échafaudage pourrait trouver son indication dans la régénération tissulaire et osseuse guidées (RTG/ROG) ou l'emploi simultané d'une membrane et d'implants. Pour commencer, nous avons dû convertir cette représentation schématique en un vrai prototype.

5.1.1 Déposition des échafaudages bicouche :

Pour l'obtention de ces échafaudages en fibres PCL électrofilées, nous avons utilisé les conditions de déposition des deux membranes « μm » et « nm ». Nous avons entrepris d'électrofiler une des couches de la membrane, puis en changeant les conditions de déposition, déposer l'autre couche sur la première déjà filée. La question était : comment faire pour réaliser une cohésion aussi parfaite que possible entre les deux couches lors du processus d'électrofilage.

Pour la déposition, nous avons commencé par la couche représentée par la membrane « nm ». Nous avons préparé une solution de PCL 13 %, et nous l'avons électrofilé à 13 kVa (3 mL.h^{-1} , 12 cm) pendant 40 min. Nous avons commencé par cette membrane car elle présente une résistance mécanique plus importante. Pour établir une cohésion des deux couches et garantir la stabilité du joint, nous avons besoin de solubiliser la couche superficielle de la membrane à l'aide d'un solvant, sans pour autant altérer le réseau fibrillaire et la membrane dans son ensemble. L'acétone nous a semblait être le solvant idoine, puisqu'il ne solubilisait le PCL que partiellement.

De l'acétone est alors aspergé sur la surface de la membrane en petite quantité, puis nous avons électrofilé la deuxième couche de la membrane représentée par la membrane « μm », en changeant simplement les conditions de déposition (solution PCL 15 %, 9 kV, 20 cm) pendant 1 h.

Suite à ces étapes de dépôt, la membrane bicouche finale est récupérée sur le collecteur, puis laissée à sécher pendant toute la nuit. La cohésion des deux couches est appréciée, pour commencer, simplement en tirant sur l'une des couches pour voir si elles sont adhérentes l'une à l'autre. S'il y a décollement de l'une des couches, la membrane est alors non sélectionnée pour la suite de l'étude.

La Figure 78 montre une micrographie MEB de la section de cette membrane bicouche en fibres PCL électrofilées. Nous pouvons clairement distinguer les deux couches de l'échafaudage, avec d'un côté la membrane « μm » (Fig. 78. droite), et de l'autre côté la membrane « nm » (Fig. 78. gauche).

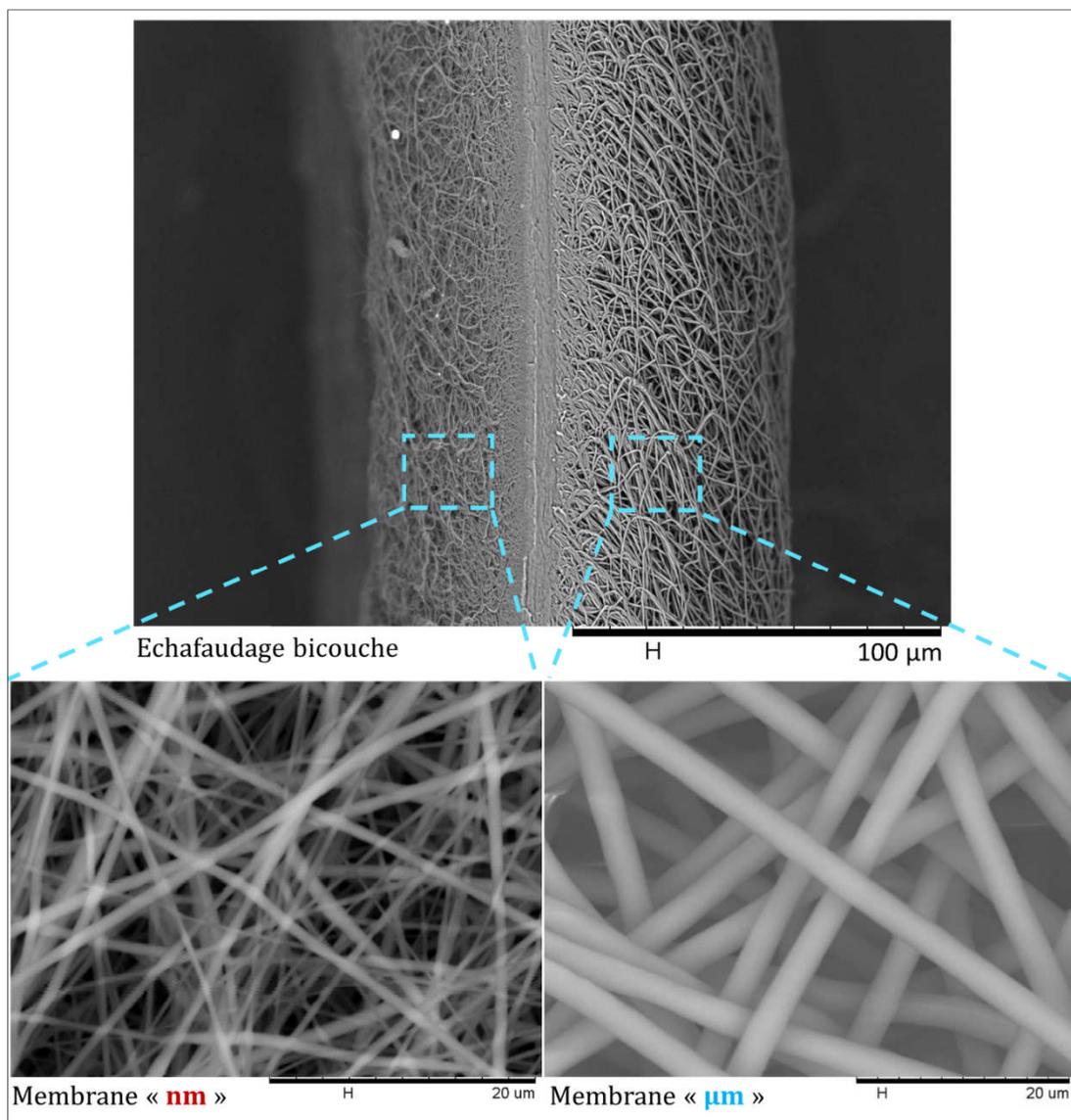


Figure 78 : Micrographies MEB de la section transversale d'un échafaudage en fibres PCL électrofilées bicouche.

Le coté de l'échafaudage constitué par la membrane « μm », qui va être en face de l'os, est conçu de façon à ce qu'il puisse promouvoir la prolifération et la pénétration/infiltration cellulaire à travers le réseau fibrillaire.

Ura. DP *et al.* (2019) [329] ont préparé trois types d'échafaudages en fibres PMMA électrofilées ; nanofibres, microfibres et rubans. Les échafaudages en microfibres ont montré les meilleurs ancrages de cellules, en comparaison avec les échafaudages en nanofibres et aux rubans. Les échantillons à base de nanofibres ont été, au début, considérés comme des échafaudages 3D, cependant, la distance entre les fibres limitait la pénétration des cellules dans l'échafaudage. Par conséquent, un diamètre des fibres d'environ de $3.5 \mu\text{m}$, comme dans le cas des microfibres, a été nécessaire pour fournir la bonne géométrie et l'espacement suffisant pour la migration des cellules à travers la structure de l'échafaudage 3D, qui a été déclenchée par l'attachement des pseudopodes¹² aux fibres situées sur des plans profonds. En résumé, les nanofibres ont facilité une plus grande dispersion des cellules à la surface, par rapport aux microfibres, où les pseudopodes cellulaires ont pu atteindre les fibres plus profondément dans le réseau électrofilé.

Nous espérons donc, avoir une bien-meilleure pénétration cellulaire (surtout pour les ostéoblastes) sur la face de l'échafaudage en regard de l'os, tandis que les cellules épithéliales resteront bloquées à la surface sur la face en regard des tissus gingivaux.

Dans cette partie de l'étude, nous avons produit des échafaudages en fibres PCL électrofilées bicouches, en nous basant sur les conditions de dépôt précédemment établies, puis nous avons procédé à leur fonctionnalisation par le greffage covalent de polyNaSS. Le greffage covalent de polyNaSS à la surface de ces échafaudages bicouche a été réalisé en utilisant les mêmes paramètres décrits dans le chapitre (IV). L'étude des propriétés mécaniques et de la réponse cellulaire a ensuite été réalisée.

¹² Les pseudopodes sont des déformations de la membrane plasmique qui permettent à une cellule de se nourrir et se déplacer en rampant sur un support dans une direction déterminée.

5.2 Etude des propriétés mécaniques des échafaudages bicouche :

L'étude mécanique des échafaudages bicouche suit le même schéma que celle des membranes en fibres PCL individuelles ; nous décrivons en premier lieu le comportement en traction puis nous exposons les résultats obtenus concernant la relaxation des échafaudages bicouche.

En effet, préalablement à la réalisation des tests mécaniques, la éprouvettes H3 découpées à partir de la membrane bicouche ont été, soit traitées pour servir de conditions témoins, soit greffées, avec du polyNaSS. Les conditions de traitement/greffage ont été résumées dans le Tableau 21 (paragraphe 4.3.).

5.2.1 Essais mécaniques :

Les éprouvettes ont été lavées et séchées en suivant le même protocole décrit précédemment, puis les tests mécaniques ont été conduits à une vitesse de sollicitation de 0.5 mm.s^{-1} .

5.2.1.1 Comportement en traction :

La première étape de cette évaluation des propriétés mécaniques pour cette membrane bicouche a été de caractériser le comportement en traction de la membrane non traitée, et la comparer aux deux membranes testées individuellement chacune. La Figure 79 présente les courbes représentatives des essais de traction à 0.5 mm.s^{-1} des deux membranes « μm » et « nm » en comparaison avec la membrane bicouche.

La courbe contrainte-déformation de la membrane bicouche non traitée, présente une allure différente des deux membranes « μm » et « nm ». En effet, nous pouvons observer que cette membrane bicouche présente un comportement intermédiaire entre les deux membranes. Elle est aussi flexible que la membrane « μm », en arrivant à une déformation Max de 550 %, tout en étant presque aussi résistante que la membrane « nm », avec une contrainte Max de $4.6 \pm 0.5 \text{ MPa}$ (enregistrée à 550 % de déformation).

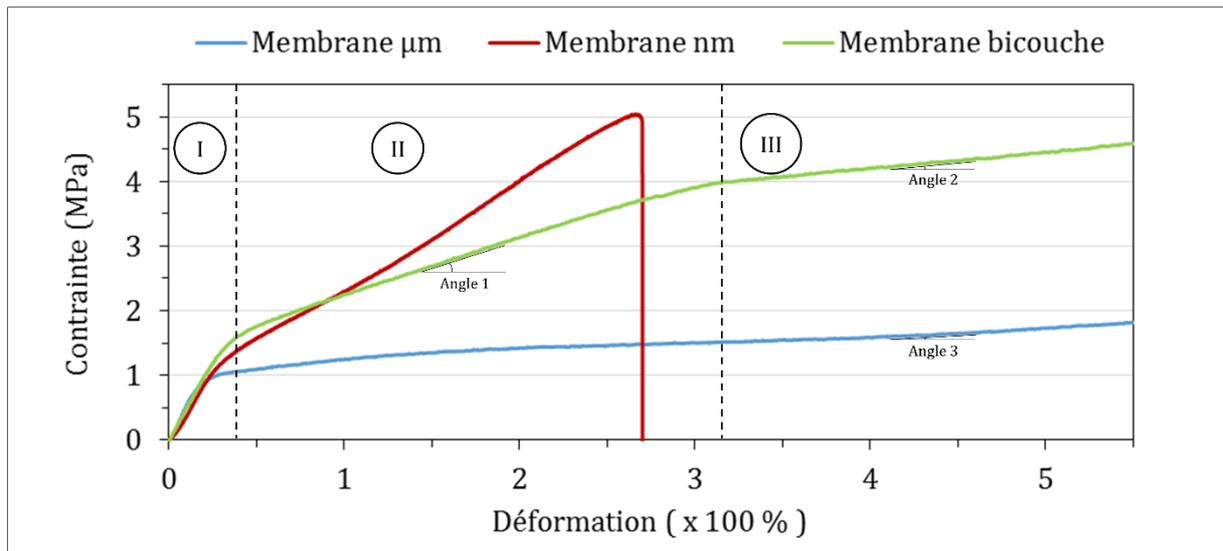


Figure 79 : Courbes contrainte-déformation des membranes « μm » et « nm » comparées à la membrane bicouche, à 0.5 mm.s^{-1} .

Nous pouvons considérer ce comportement comme étant « hybride » entre les deux membranes constituant les deux couches de cette bicouche. Les courbes de contrainte-déformation font apparaître, un changement de pente à partir de $314 \pm 6 \%$ de déformation, qui n'est pas présent sur les deux membranes individuelles.

L'allure de la courbe de la membrane bicouche peut être décomposée en trois parties (Fig. 79) : (I) un premier domaine correspondant au domaine élastique qui va de 0 à $33 \pm 2 \%$ de déformation (0 à 25 % pour la membrane « μm » et 27 % pour la membrane « nm » individuelles), suivi par (II) un premier domaine plastique avec un angle de $41 \pm 4^\circ$ (Fig. 79. angle 1), allant jusqu'à une déformation $314 \pm 6 \%$, et (III) un deuxième domaine plastique qui se prolonge jusqu'à la déformation Max et formant un angle de $15.6 \pm 5^\circ$ (Fig. 79. angle 2). Ce deuxième domaine plastique présente un module élastique égal à $0.21 \pm 0.08 \text{ MPa}$.

Nous pensons que ce nouveau comportement hybride, offert par la membrane bicouche, est du à sa composition. Les fibres micrométriques de la membrane « μm » assurent une grande ductilité, pendant que les fibres nanométrique de la membrane « nm » augmentent la résistance de la structure. Cela revient à dire, que cette membrane est un composite entre deux membranes lui conférant toutes les deux des propriétés uniques et améliorées.

Le scénario suivant semble possible sans qu'il soit étayé, pour autant, par des moyens d'investigations complémentaires. Au début du test de traction et jusqu'à 314 ± 6 % de déformation, c'est les fibres nanométriques de la membrane « nm » qui supportent l'effort imposé, expliquant pourquoi le comportement de cette membrane bicouche ressemble à celui de la membrane « nm ». La contrainte Max enregistrée à cette déformation est de 4 ± 0.9 MPa, ce qui est inférieur à la contrainte Max de la membrane « nm » toute seule, et cela peut être expliqué simplement par l'épaisseur réduite de la membrane « nm » dans la membrane bicouche par rapport à la membrane « nm » individuelle. A partir du changement de pente (c.à.d. le deuxième domaine plastique), nous pensons que c'est les fibres micrométriques qui prennent le relais et supportent donc cet allongement ou déformation jusqu'à 550 %. En effet, ce deuxième domaine plastique présente un angle de 15.6 ± 5 ° qui lorsqu'il est comparé à l'angle formé par la fin de la courbe de contrainte-déformation de la membrane « μm » individuelle reste assez proche (11.8 ± 2 °). Le module élastique de ce deuxième domaine plastique de la membrane bicouche (0.21 ± 0.08 MPa) est lui aussi très proche du module élastique de la membrane « μm », et qui est égale à 0.16 ± 0.06 MPa (les deux modules élastiques ont été mesurés au même point).

A noter, que nous n'avons pas eu de fracture apparente des fibres nanométriques lorsque nous dépassons une déformation de 314 ± 6 %, malgré le changement de pente constaté dans le deuxième domaine plastique.

La deuxième étape consistait à caractériser le comportement en traction des différents éprouvettes témoins et traitées/greffées de la membrane bicouche. Les courbes contrainte-déformation sont présentées dans la Figure 80.

Le module d'élasticité, la contrainte Max et la déformation Max ont été calculés et le Tableau 30 rassemble ces valeurs.

En analysant les résultats, nous pouvons observer que l'évolution des propriétés mécaniques de cette membrane bicouche suit les mêmes tendances observées sur les membranes « μm » et « nm ». Ces résultats étaient attendus étant donné que même si le comportement global de la membrane bicouche semble être différent des deux membranes individuellement, la membrane bicouche reste une membrane produite avec des fibres PCL électrofilées.

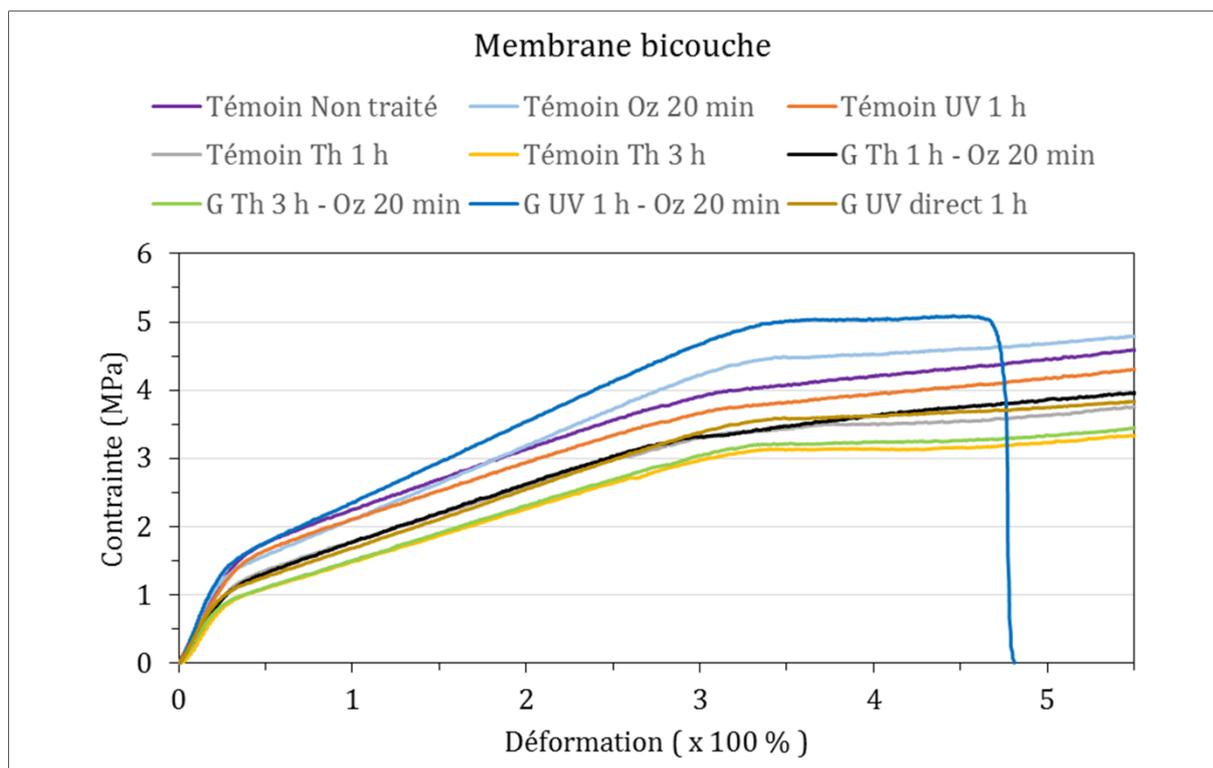


Figure 80 : Coubes contrainte-déformation, à 0.5 mm.s⁻¹, des éprouvettes traités/greffées et témoins de la membrane bicouche.

Tableau 30 : Données mécaniques obtenues à partir des courbes expérimentales des différents échantillons de la membrane bicouche à 0.5 mm.s⁻¹.

Membrane bicouche				
Condition	E (MPa)	Déformation Max (%)	Contrainte Max (MPa)	
Témoins	Non traité	4.92 ± 0.15	> 550	4.60 ± 0.50
	Ozoné 20 min	5.69 ± 0.22	> 550	4.78 ± 0.31
	UV 1 h	4.56 ± 0.21	> 550	4.31 ± 0.16
	Chaleur 1 h à 45 °C	4.23 ± 0.12	> 550	3.81 ± 0.23
	Chaleur 3 h à 45 °C	4.06 ± 0.53	> 550	3.42 ± 0.34
Greffés	G Th 1 h - Oz 20 min	4.11 ± 0.19	> 550	3.94 ± 0.29
	G Th 3 h - Oz 20 min	4.04 ± 0.48	> 550	3.44 ± 0.17
	G UV 1 h - Oz 20 min	6.19 ± 0.62	480 ± 14	5.02 ± 0.11
	G UV direct 1 h	4.52 ± 0.19	> 550	3.86 ± 0.32

L'ozonation semble avoir un réel effet sur les propriétés de la membrane, et cet effet est accentué lorsque cette étape d'ozonation est suivie par une exposition aux irradiations UV. En effet, sur toutes les éprouvettes testées, seules celles greffées UV 1 h - Oz 20 min ont présenté une rupture de toutes les fibres à 480 ± 14 % de déformation, ce qui confirme

l'effet néfaste de cette combinaison des irradiations UV et de l'ozonation sur les propriétés mécaniques.

Les irradiations UV seules, semble ne pas avoir d'effet important sur les propriétés mécaniques. Le traitement sous chaleur à 45 °C a provoqué les mêmes effets sur les propriétés mécaniques que ce qui a été observé lors des tests de traction sur les deux membranes.

Ces résultats doivent néanmoins être plus approfondis, en cherchant d'éventuels effets des différentes étapes de traitement sur ; les changements de pentes observés sur cette membrane bicouche, les limites de chacun des trois différents domaines, ainsi qu'une étude de la microstructure de cette membrane bicouche sous MEB tout au long de ce test de traction.

5.2.1.2 Etude de la relaxation :

Dans cette étude des propriétés mécaniques pour cette membrane bicouche, nous avons aussi étudié les temps de relaxation en suivant la même méthodologie décrite pour les deux membranes individuellement. Le Tableau 31 regroupe les résultats du calcul des temps de relaxation pour cette membrane bicouche.

Tableau 31 : Temps de relaxation de la membrane bicouche pour chaque condition de traitement.

		Membrane bicouche	
	Condition	t₁ (Court)	t₂ (Long)
Témoins	Non traité	8.005 ± 0.2	225.609 ± 04
	Oz 20 min	6.892 ± 0.5	192.827 ± 10
	UV 1 h	7.145 ± 0.3	197.665 ± 08
	Th 1 h	*	*
	Th 3 h	7.172 ± 0.4	196.482 ± 12
Greffés	Th 1 h - Oz 20 min	7.435 ± 0.3	212.773 ± 14
	Th 3 h - Oz 20 min	9.835 ± 1.6	234.392 ± 37
	UV 1 h - Oz 20 min	*	*
	UV direct 1 h	8.066 ± 0.7	217.629 ± 05

* Problème lors de l'acquisition des données.

En analysant les temps de relaxation obtenus pour cette membrane bicouche, nous pouvons observer que, contrairement aux essais effectués sur les membranes « μm » et

« nm » individuellement, à part les échantillons greffés UV direct 1 h, les différents traitements subis par la membrane ont amené une diminution des temps de relaxation courts et longs. Notons tout de même que pour les échantillons greffés Th 3 h – Oz 20 min, les temps de relaxation ont augmenté, mais ces valeurs présentent des écarts types assez conséquent par rapport aux autres mesures. Par ailleurs, nous n'avons pas pu enregistrer les temps de relaxation pour les échantillons greffés UV 1 h – Oz 20 min et les échantillons témoins Th 1 h à cause d'un problème d'acquisition des données lors du test.

Le traitement à l'ozonation (témoins Oz 20 min) a provoqué, semble-t-il, la plus importante baisse des temps de relaxation, mais nous n'avons pas pu vérifier cette tendance puisque nous n'avons pas eu les résultats de l'ensemble des échantillons ayant subi cette étape d'ozonation. L'absence des valeurs des temps de relaxation pour les témoins Th 1 h et les greffés UV 1 h – Oz 20 min ne permet pas de saisir toutes les variations et les effets possible des traitements sur ces éprouvettes. Il convient donc de refaire toutes les analyses sur la totalité des conditions en une seule fois, et non juste refaire les deux conditions, et c'est d'ailleurs pour cette raison que nous n'avons, malheureusement, pas pu reconduire l'intégralité de ce test de relaxation sur la membrane bicouche.

Il est intéressant de noter que, que ce soit pour la membrane « μm », « nm » ou pour cette membrane bicouche, le greffage UV direct 1 h sur les éprouvettes n'a pas eu d'effet conséquent sur les temps de relaxation.

L'étude des temps de relaxation sur la membrane bicouche doit, cependant, elle aussi être approfondie en comparant plusieurs vitesses de déplacement, mais aussi en débutant la relaxation à différentes déformation (domaine élastique, 1^{er} domaine plastique et 2^{ème} domaine plastique). Cela pourrait peut-être aider à mettre en évidence de véritables différences entre cette membrane bicouche et les deux membranes individuelles en termes de comportement à la relaxation.

Le fait est que les variations sur les temps de relaxation calculés dans cette étude ne soient que rarement très importantes, une étude statistique avec un nombre d'échantillons important doit être conduite avant de tirer des conclusions quant aux effets possibles des différents traitements sur le comportement en relaxation de ces différentes membranes en fibres PCL électrofilées.

5.3 Etude de la réponse biologique :

Ces dernières années, les matériaux artificiels, en particulier les polymères synthétiques, ont pris une importance croissante dans diverses applications biomédicales, y compris l'ingénierie tissulaire et la médecine de transplantation. Cependant, pour la construction de tissus et organes bioartificiels avancés, les matériaux ne devraient pas seulement être tolérés passivement par les cellules de l'organisme (comme cela était souvent le cas dans les matériaux "classiques" des premières générations) mais devraient promouvoir activement et de manière contrôlable des réponses cellulaires spécifiques. En d'autres termes, les échafaudages cellulaires artificiels devraient agir comme des analogues de la MEC naturelle, c.à.d. que ces échafaudages doivent réguler l'étendue et la force de l'adhésion cellulaire par la liaison entre les récepteurs d'adhésion cellulaire (p. ex. intégrines) et les parties actives des molécules de la MEC (p. ex. les séquences d'acides aminés spécifiques Arg-Gly-Asp) [330].

Les propriétés physiques et chimiques de la surface d'un biomatériau, notamment sa mouillabilité, sa rugosité, sa topographie et ses propriétés mécaniques jouent un rôle déterminant dans l'adhésion, la croissance et la différenciation cellulaire. La cytocompatibilité, incluant l'absence de toxicité et la bonne intégration cellulaire, en est une condition clé.

Dans cette partie de l'étude, l'objectif principal des expériences de l'étude de la réponse cellulaire était d'observer les différences de comportement cellulaire sur les deux membranes constituant les deux côtés de l'échafaudage bicouche, et d'évaluer l'influence des 4 conditions de greffage de polyNaSS sur ces échafaudages en fibres PCL électrofilées présentant différents taux de groupements sulfonates greffés et des degrés d'hydrophilie de surface différents, et ainsi comparer ces conditions entre elles aussi bien qu'avec des échafaudages non greffés.

Des fibroblastes L929 ont été utilisés pour évaluer cette réponse biologique sur l'ensemble des surfaces afin d'apprécier la cytotoxicité, l'adhérence, l'étalement et la morphologie cellulaire.

Pour des raisons pratiques, nous avons réalisé cette étude de la réponse cellulaire sur chaque membrane (μm et nm) séparément l'une de l'autre. Par la suite, les résultats sont comparés et le comportement cellulaire ainsi que l'influence du greffage sont analysés.

5.3.1 Evaluation de la cytotoxicité :

Un test MTT a été réalisé, comme première étape de l'évaluation de la cytocompatibilité des échafaudages greffés polyNaSS, qui ont été préalablement conditionnés et stérilisés, en utilisant des fibroblastes à une densité d'ensemencement de 50 000 cellules par échafaudage. Des cellules cultivées sur des plaques de culture cellulaire traitée en polystyrène (TCPS) ont servi de référence, et la détermination de la viabilité cellulaire a été effectuée en suivant le protocole décrit dans le paragraphe 2.6.4.

La viabilité des fibroblastes a été évaluée à 2 jours, et les résultats de viabilité cellulaire sont présentés dans la Figure 81. Le pourcentage de cellules viables est plus élevé pour les puits témoins. Ce résultat était attendu d'une part, parce que les plaques de culture (TCPS) sont conçues pour favoriser l'adhésion et la prolifération cellulaire, et d'autre part parce que les échafaudages en fibres PCL présentent une architecture tridimensionnelle comparée à la surface plane des puits TCPS, résultant d'un temps de latence nécessaire aux cellules pour s'adapter à ces surfaces.

Les échafaudages non greffés ont présenté une viabilité cellulaire de 88.3 ± 4.8 %, ce résultat est conforme avec la littérature [331], et confirme la cytocompatibilité du polymère PCL, même si cette valeur est inférieure au contrôle cellulaire positif (sur TCPS). Les échafaudages greffés PolyNaSS ont quant à eux montré une viabilité cellulaire > 90 %. Parmi eux, les échafaudages G Th 3 h - Oz 20 min et G UV 1 h - Oz 20 min ont montré les pourcentages les plus hauts ≈ 93 %.

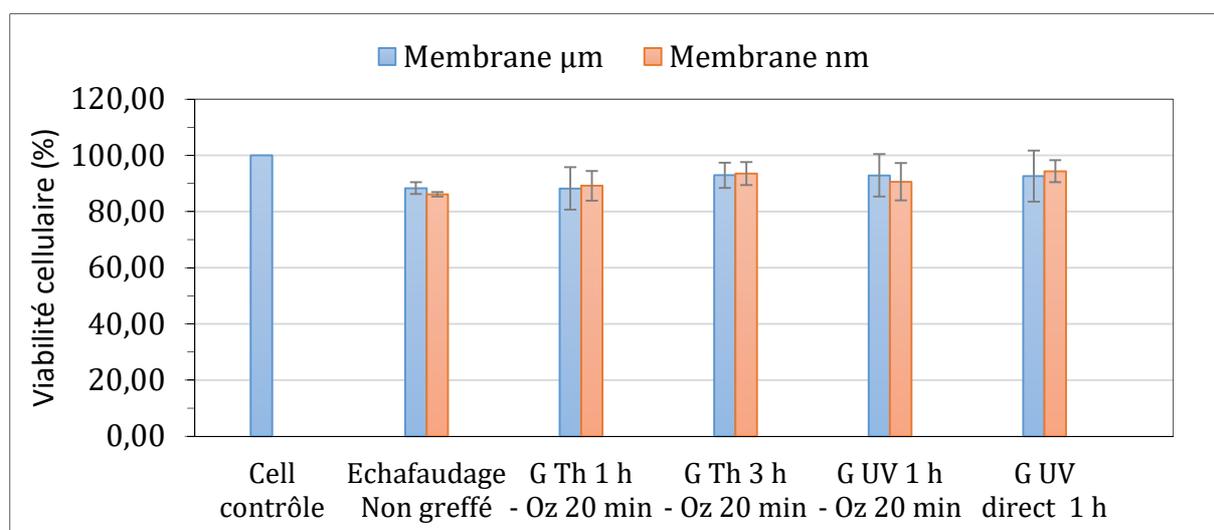


Figure 81 : Pourcentage de viabilité des cellules fibroblastes L929 lorsqu'elles sontensemencées pendant 2 jours sur des différents échafaudages greffés polyNaSS et non greffés.

Par ailleurs, les valeurs de viabilité cellulaire trouvées pour les différents échafaudages greffés sont assez similaires, rendant difficile de conclure qu'il existe une différence de viabilité cellulaire entre les différentes conditions de greffage et/ou entre les deux membranes testées, et ce malgré des taux de greffage différents et des surfaces plus ou moins hydrophiles/hydrophobes.

Ces mesures du test MTT ont cependant prouvé/confirmé la nature non cytotoxique du polyNaSS greffé et ont montré, dans les conditions testées, que le greffage de polyNaSS sur ces échafaudages en fibres PCL électrofilées améliorait légèrement la viabilité cellulaire en dépit du court temps de contact direct (48 h) entre les cellules et ces échafaudages.

Le pourcentage de cellules viables (métaboliquement actives) sur les deux différentes membranes quel que soit la condition de greffage utilisée détermine l'aptitude de ces échafaudages pour l'application prévue.

5.3.2 Adhésion, étalement et morphologie cellulaire :

Il est bien connu que les cellules dépendantes de l'ancrage, ne se divisent pas sans extension préalable sur le substrat de croissance, et peuvent même subir une Anoïkose¹³, c.à.d. une forme spécifique d'apoptose, qui est due à manque d'adhésion [332]. Par conséquent, dans la première phase d'étalement cellulaire, la taille de la surface d'étalement est en corrélation positive avec l'activité de prolifération cellulaire [330].

L'étalement cellulaire stimule la prolifération cellulaire par au moins deux mécanismes, soit les voies biochimiques et mécaniques [333-334]. Ces deux mécanismes commencent par l'adsorption des molécules médiatrices de l'adhésion cellulaire à partir des fluides biologiques à la surface du matériau, et par la liaison des sites actifs de ces molécules avec des récepteurs d'adhésion cellulaire, qui impliquent des molécules d'adhésion intégrine et non-intégrine (p. ex. à base de protéoglycanes). L'occupation des récepteurs d'adhésion par leurs ligands conduit au regroupement de ces récepteurs dans des domaines spécifiques appelés "plaques d'adhésion" ou "site d'adhésion", où les

¹³ L'Anoïkose est une forme spécifique d'apoptose, qui est due à un défaut d'interaction entre la cellule et la matrice extracellulaire : lorsque les intégrines de la cellule ne sont plus liées à des protéines de cette matrice, elles envoient un signal de mort cellulaire.

récepteurs communiquent avec de nombreuses protéines structurales et de signalisation, par lesquelles ils sont associés au cytosquelette d'actine [335].

L'étude de l'adhésion et de l'étalement mais aussi de la morphologie cellulaire paraît alors fondamentale pour évaluer l'effet, sur la réponse cellulaire, de la fonctionnalisation de ces échafaudages en fibres PCL électrofilées.

5.3.2.1 Fixation des cellules sans déshydratation :

L'adhésion, l'étalement et la morphologie des fibroblastes sur les échafaudages PCL non greffés et greffés (G Th 1 h - Oz 20 min, G Th 3 h - Oz 20 min, G UV 1 h - Oz 20 min et G UV direct 1 h) ont été évalués après 4 et 7 jours de culture par analyse de micrographies SEM des échafaudages sur lesquels les cellules ont été fixées pendant 30 min à 4 °C dans du paraformaldéhyde/PBS à 4 % (sans déshydratation).

Mais avant cela, l'adhésion initiale des fibroblastes sur les échafaudages « μm » et « nm » non greffées et greffées polyNaSS a été examinée après 48 h de culture, en analysant des micrographies MEB des fibroblastes fixés sur les échafaudages (Fig. 82).

Que ce soit sur les surfaces greffées ou non greffées, les cellules ont adhéré aux échafaudages en s'attachant aux fibres constituant le réseau fibrillaire. Cependant, l'adhésion des fibroblastes aux fibres a été différente en fonction de la structure de l'échafaudage. En effet, nous pouvons observer que les fibroblastes s'attachent aux fibres micrométriques (Fig. 82 .droite) en essayant de suivre la direction des fibres, et s'accrochent aux angles formés par l'intersection de deux ou plusieurs fibres, en s'attachant simultanément à des fibres situées sur des plans différents. Sur les échafaudages « nm » (Fig. 82. gauche) où les fibres sont de plus petit diamètre et les pores beaucoup plus étroits, les fibroblastes tendent à rester en surface en formant plus ou moins, en fonction des conditions de greffage, des agrégats (ou amas) de cellules. C'est d'ailleurs pour cette raison que les fibroblastes paraissent plus étalés sur les échafaudages « nm ».

Par ailleurs, pour apprécier au mieux les différences en termes de morphologie et/ou étalement des cellules en fonction des différentes conditions de greffage; nous avons analysé en détails les micrographies MEB prises à 4 et 7 jours.

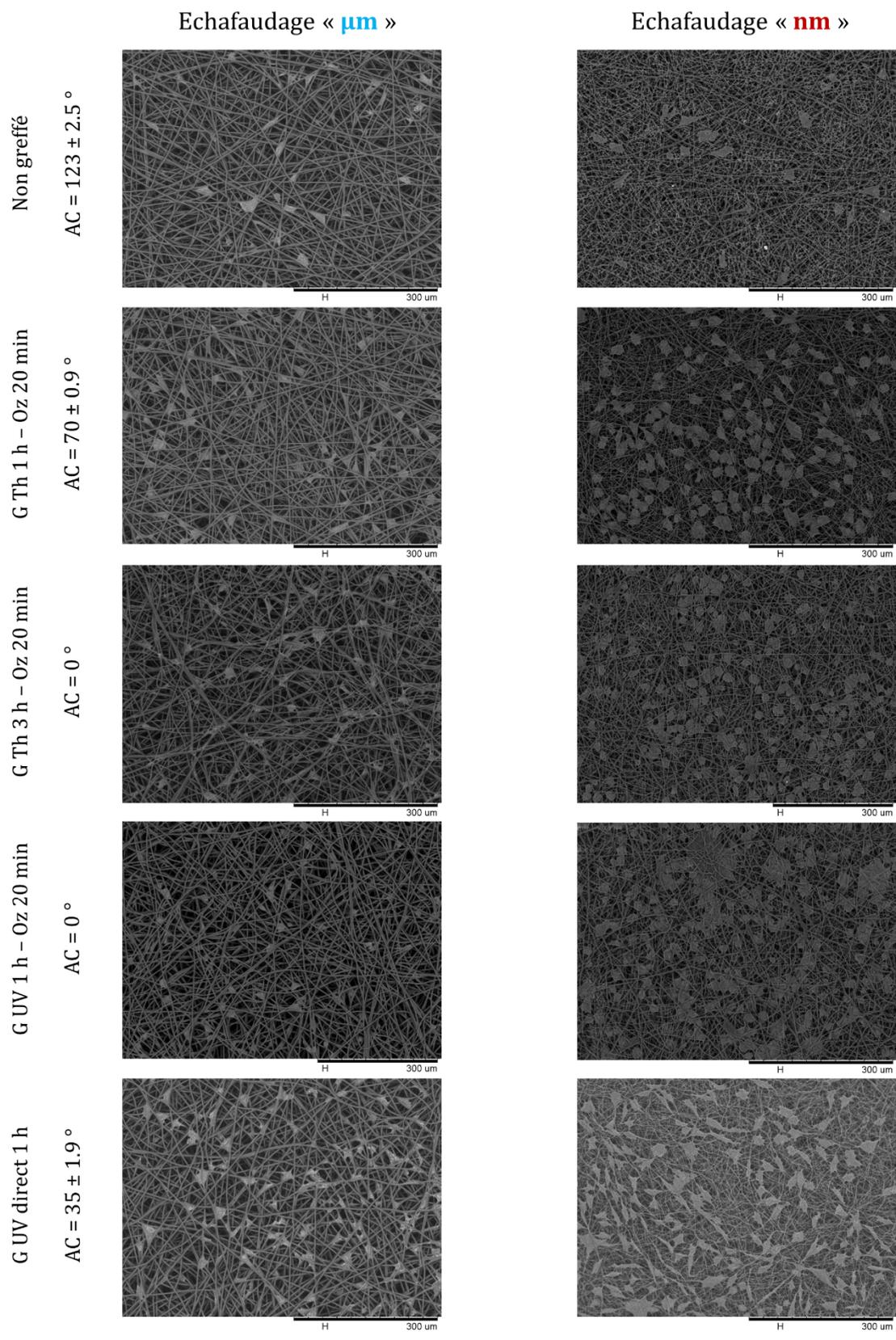


Figure 82 : Micrographies MEB de fibroblastes L929 fixés et adhérents sur des échafaudages en fibre PCL non greffés et greffés polyNaSS prises à 2 jours et valeurs des angles de contact pour chaque condition.

Les micrographies MEB des fibroblastes fixés sur les différents échafaudages à 4 jours (Fig. 83) et à 7 jours (Fig. 85) de culture, montrent que les cellules se sont attachées au réseau des échafaudages à ces deux temps pour tous les échantillons.

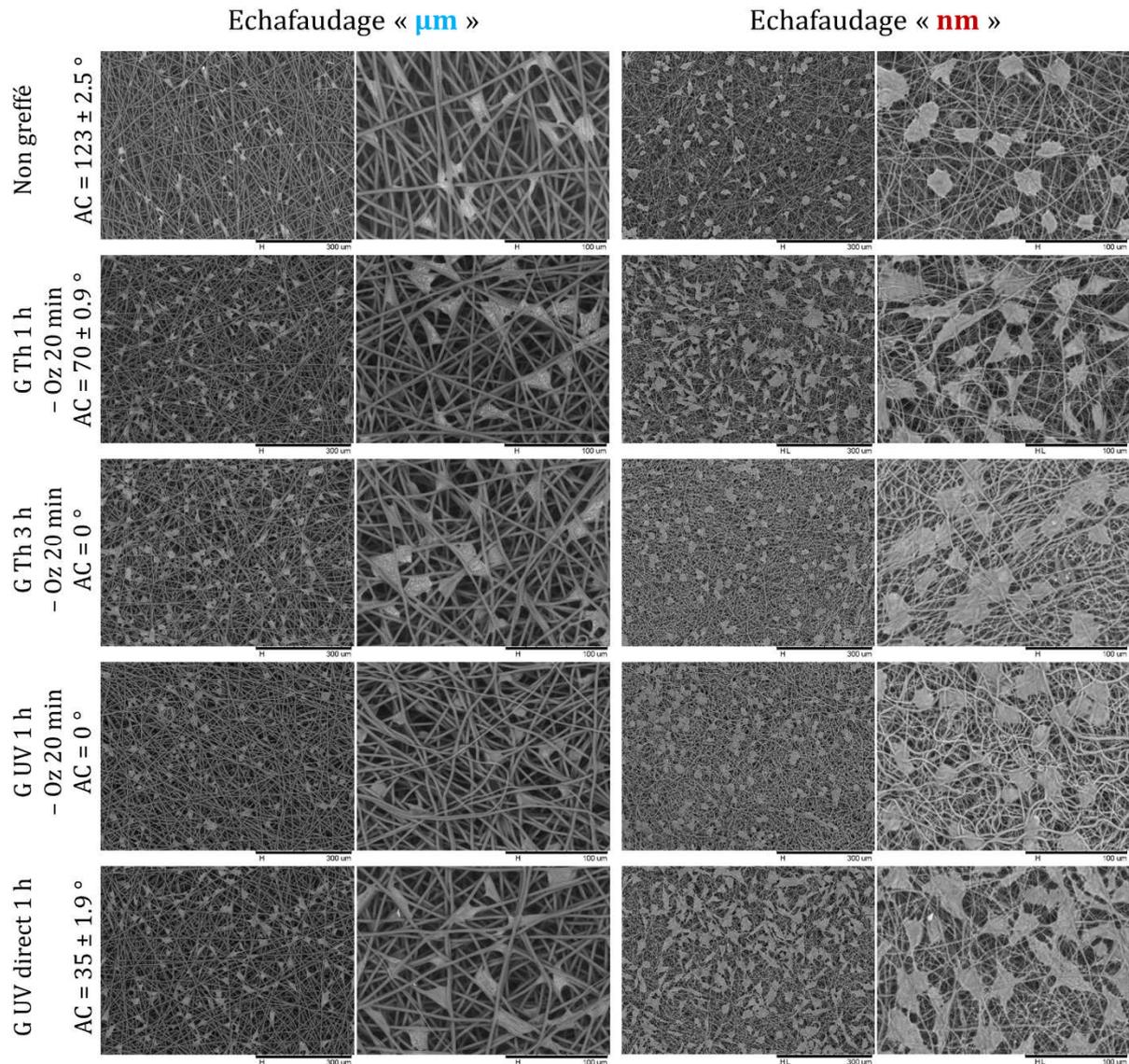


Figure 83 : Micrographies MEB à différents grossissements des fibroblastes L929 fixées et étalées sur les échafaudages en fibre PCL non greffés et greffés polyNaSS prise à 4 jours, ainsi que les valeurs des angles de contact pour chaque condition.

Pour toutes les observations, les cellules présentent une morphologie de cellules saines et nous n'avons pas observé de cellules nécrosées, confirmant les résultats de cytotoxicité. Aucun indice de mort cellulaire due à une éventuelle toxicité des échafaudages qu'ils soient greffés ou pas n'a été observé. Cependant, les fibroblastes adoptent différentes morphologies en fonction du type d'échafaudage ainsi que des conditions de greffage.

En comparant les deux échafaudages entre eux, nous pouvons nous rendre compte que sur l'échafaudage « μm » présentant une structure tridimensionnelle, grâce à la taille des pores qui peuvent atteindre $30\ \mu\text{m}$, les cellules se comportent différemment de l'échafaudage « nm » où elles sont sur une surface qui peut être assimilée plus ou moins à une surface plane. La surface d'adhérence des fibroblastes apparaît, de ce fait, plus importante de manière générale sur les échafaudages « nm ». Cependant, cette observation ne renseigne pas forcément d'un meilleur étalement des cellules. En effet, sur les échafaudages « μm », les cellules ne trouvent pas de support sur lequel reposé directement (en général) et s'attachent donc comme elles peuvent directement aux fibres, et par conséquent, les cellules suivent l'alignement ou la direction des fibres, les faisant apparaître plus allongée mais moins étalées.

Nous allons à présent comparer l'étalement et la morphologie cellulaire en fonction de la condition de greffage. D'après les micrographies, au jour 4 (Fig. 83), pour les échafaudages PCL non greffés (angle de contact $\approx 123 \pm 2.5^\circ$), les cellules ne sont pas bien étalées, cela étant dû certainement au caractère hydrophobe prononcé des surfaces non greffés.

Sur les échafaudages greffés Th 1 h - Oz 20 min (angle de contact $\approx 70 \pm 0.9^\circ$) et greffés UV direct 1 h (angle de contact $\approx 35 \pm 1.9^\circ$), les cellules sont de forme polygonale avec un très bon étalement. Elles s'attachent aux fibres environnantes à différents points, avec la formation à certains endroits de protrusions cytoplasmiques qui permettent de fixer les cellules sur des fibres distantes (Fig. 84. Flèche jaune).

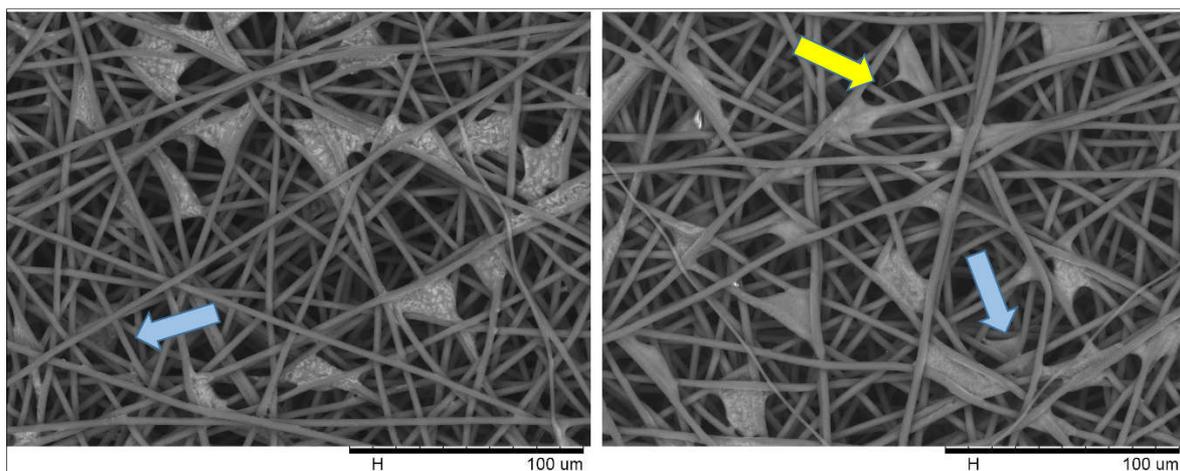


Figure 84 : Micrographies MEB d'échafaudages « μm » greffés : (gauche) Th 1 h - Oz 20 min et (droite) UV direct 1 h. La flèche jaune montre une protrusion cytoplasmique et les flèches bleus montrent des cellules qui ont pénétré sur des plans profonds.

Les analyses des micrographies des échafaudages greffés Th 3 h - Oz 20 min et UV 1 h - Oz 20 min qui présentent tous deux un angle de contact de 0°, ont montré que les cellules ont pris une forme plus arrondie et ne sont pas bien étalées sur les fibres (la forme peut être clairement observée à un grossissement de 100 µm). Cette forme arrondie est retrouvée sur les deux types d'échafaudages, même si elle est plus prononcée sur les échafaudages « nm » à cause des cellules restant en surface. De plus, sur ces 2 conditions de greffage, les cellules ont tendance à s'individualiser sans étendre leur cytoplasme et sont donc fixées aux fibres sur moins de points d'adhésion que les échafaudages greffés présentant un angle de contact modérément hydrophile (supérieur à 0°).

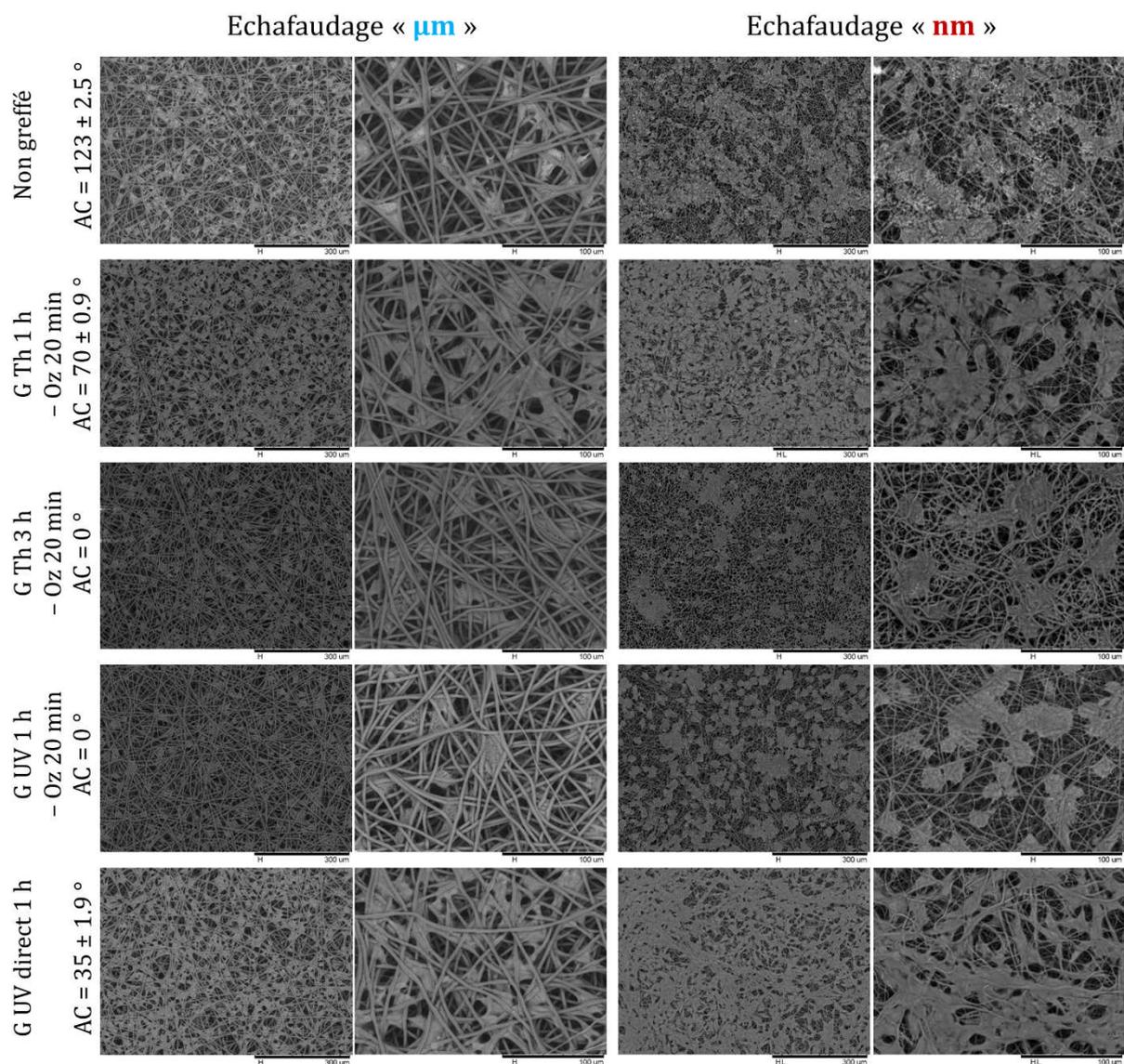


Figure 85 : Micrographies MEB à différents grossissements des fibroblastes L929 fixées et étalées sur les échafaudages en fibre PCL non greffés et greffés polyNaSS prise à 4 jours, ainsi que les valeurs des angles de contact pour chaque condition.

Au jour 7 (Fig. 85), le nombre de cellules sur les échafaudages a augmenté par rapport au jour 4, pouvant s'interpréter par une prolifération cellulaire. Cela démontre aussi que sur les échafaudages « μm », les cellules ont pris le temps de s'adapter à cette structure tridimensionnelle, formée par les différentes couches de fibres superposées les unes aux autres, très différente d'une surface plane.

Sur les échafaudages non greffés, nous avons observé une mauvaise répartition/distribution des cellules sur la surface des échafaudages, surtout pour les échafaudages « nm ». Cela est aussi le cas pour les cellules cultivées sur les échafaudages greffés Th 3 h – Oz 20 min et UV 1 h – Oz 20 min (super hydrophiles). L'étalement des cellules sur ces échafaudages non greffés a été moindre.

Nous pouvons également observer, pour les échafaudages « μm », que les cellules ont tendance à rester le plus souvent à la surface des échantillons non greffé, tandis que pour les échafaudages greffés qui présentent des surfaces hydrophiles, elles ont été bien intégrées au réseau de l'échafaudage et s'accrochent aux fibres situées sur différents plans. Cependant, lorsque les échafaudages greffés sont comparés entre eux et compte tenu des différences en termes de taux de greffage et de degré d'hydrophilie de la surface, nous avons observé que les cellules cultivées sur des surfaces super hydrophiles (G Th 3 h - Oz 20 min et G UV 1 h - Oz 20 min) étaient moins étalées et tendaient à devenir individualisées révélant beaucoup d'espaces de l'échafaudage non couverts par les cellules.

Sur les échafaudages modérément greffés (G Th 1 h - Oz 20 min et UV direct 1 h ; surfaces hydrophiles), les cellules sont très bien étalées avec des extensions cytoplasmiques dans toutes les directions en adhérant aux fibres. Elles sont bien réparties/distribuées sur toute la surface, contrairement aux cellules cultivées sur les échafaudages super hydrophiles ou non greffés. De plus, en s'allongeant et en proliférant avec une bonne répartition/distribution sur la surface, les cellules s'assemblent et s'unissent pour former ce qui ressemble à un tapis cellulaire, qui peut être clairement observé à un grossissement de $300\ \mu\text{m}$. Par conséquent, les cellules ont recouvert la majeure partie de la surface de l'échafaudage pour ces deux conditions. Ces résultats au jour 7 confirment les tendances observées aux jours 2 et 4.

Ces observations effectuées au MEB apportent aussi des preuves de la prolifération cellulaire puisque, à un temps de culture plus long, la surface des échafaudages, est recouverte d'un tapis cellulaire comme le montre la Figure 85.

5.3.2.2 *Marquage des cellules pour la microscopie à fluorescence :*

5.3.2.2.1 Analyse qualitative :

Pour permettre une analyse précise et détaillée de la morphologie des cellules adhérentes et étalées sur les échafaudages, nous avons réalisé un marquage des noyaux et du cytosquelette cellulaires. Le noyau a été marqué au DAPI et la phalloïdine a été utilisée pour colorier les fibres d'actine du cytosquelette. Ce marquage est réalisé après 3 jours d'ensemencement des cellules sur les échafaudages.

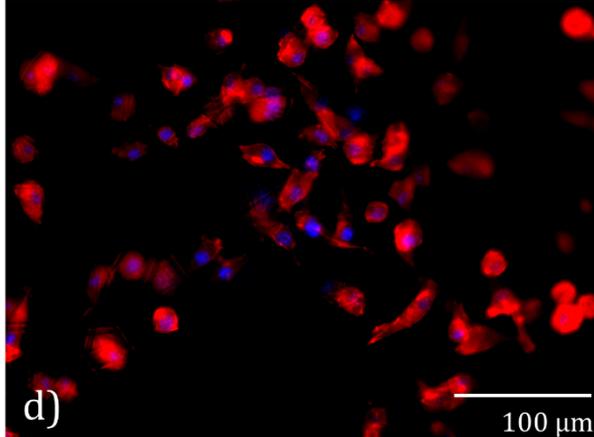
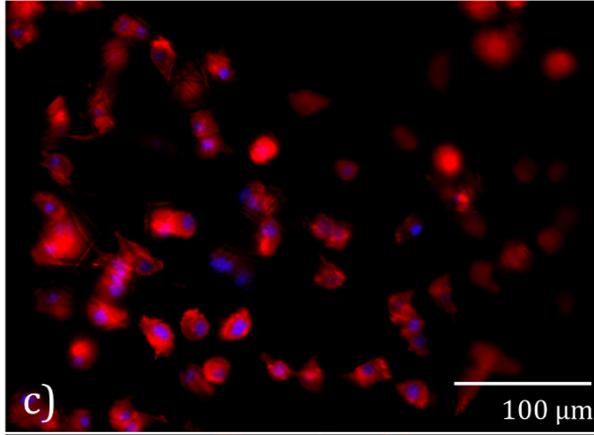
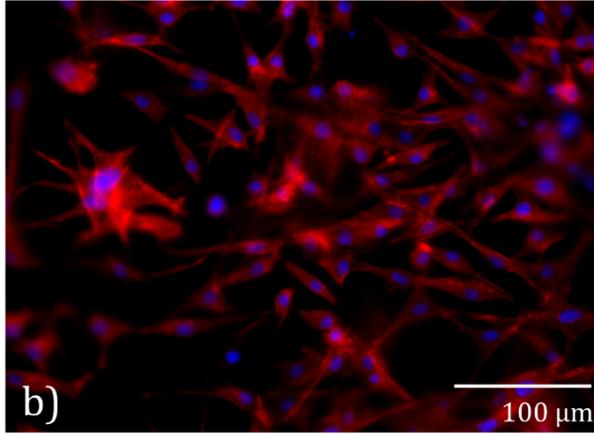
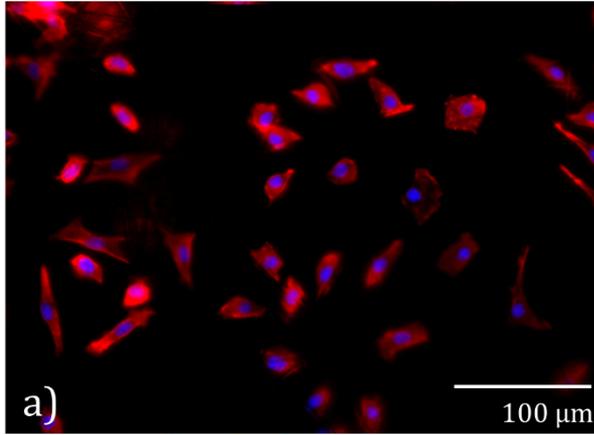
Après observation des surfaces à l'aide d'un Vidéo-microscope Zeiss Axiolab et traitement des images avec le logiciel « ImageJ », les micrographies obtenues sont présentées dans la Figure 86.

L'observation en microscopie à fluorescence apporte plus d'informations. Trois morphologies cellulaires peuvent être distinguées des résultats obtenus. Sont présentes des cellules non étalées et rondes. C'est le cas notamment des cellules cultivées sur des échafaudages non greffés (Fig. 86. a. f.) et les échafaudages, « μm » et « nm », à très haut taux de greffage (surfaces super hydrophiles ; G Th 3 h – Oz 20 min et G UV 1 h – Oz 20 min) (Fig. 85. c. h. d. i.) Celles-ci peuvent être opposées aux deux autres morphologies cellulaires qui, elles, sont bien étalées.

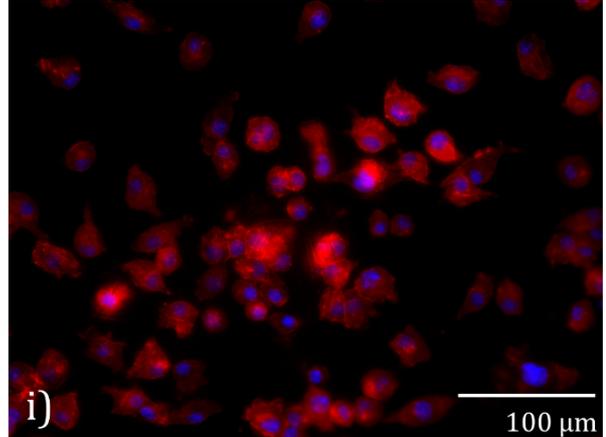
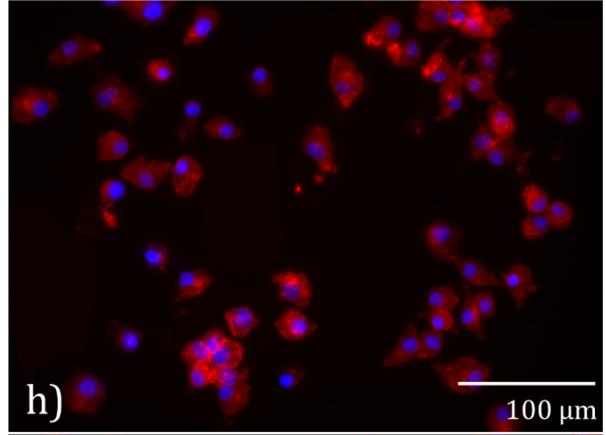
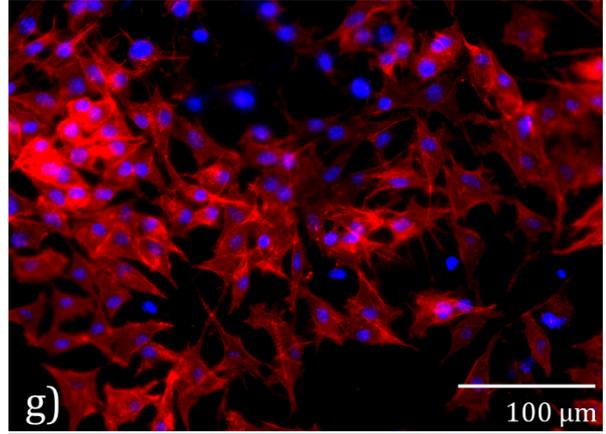
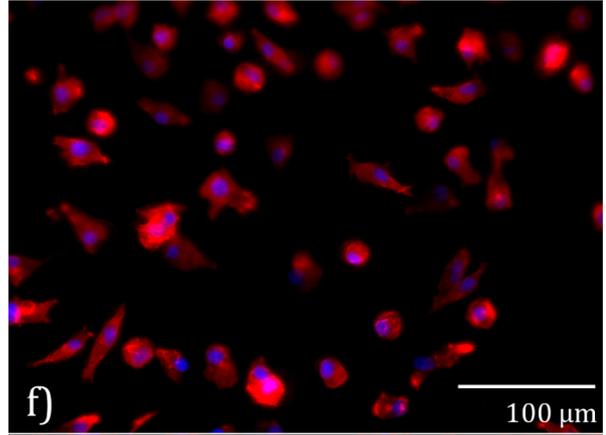
Les cellules rondes non étalées se trouvent sur tous les échafaudages non greffés. Sur ces surfaces non traitées, c'est la seule morphologie qu'il est possible d'observer. Ceci montre que malgré la cytocompatibilité du polymère PCL non traité, le caractère hydrophobe de la surface est impropre au bon étalement des fibroblastes L929 à 3 jours d'ensemencement.

Parmi les cellules étalées, deux morphologies peuvent être distinguées. Premièrement, les cellules étalées uniformément et présentant une forme dite polygonale. Deuxièmement, des fibroblastes étalés non uniformément et suivant une direction particulière. Dans ce cas, chaque cellule possède son propre axe privilégié (ou plusieurs axes). Cette morphologie peut être qualifiée de fusiforme (Fig. 86. b. e.).

Echafaudage « μm »



Echafaudage « nm »



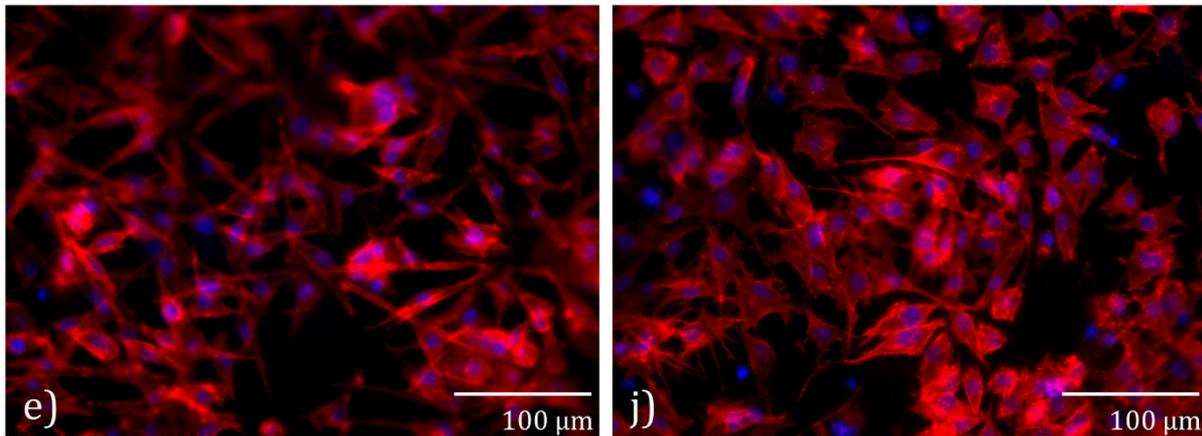


Figure 86 : Morphologie des fibroblastes L929 après 72 h d'incubation sur les échafaudages en fibres PCL électrofilées. Les images sont réalisées au microscope à fluorescence au grossissement x 20. Non greffés (a, f), G Th 1 h – Oz 20 min (b, g), G Th 3 h – Oz 20 min (c, h), G UV 1 h – Oz 20 min (d, i) et G UV direct 1 h (e, j).

Nous pouvons observer que ces deux morphologies pour les cellules étalées sont, chacune, spécifiques au type d'échafaudage utilisé, ce qui met en évidence l'effet de la microstructure sur le comportement des fibroblastes entre ces deux échafaudages.

En effet, la morphologie polygonale où les fibroblastes sont étalés en ne suivant aucune direction particulière n'est observée que pour les échafaudages « nm » greffés Th 1 h – Oz 20 min et UV direct 1 h (respectivement Fig. 86. g. j.). Cette morphologie des fibroblastes conforte et confirme les observations effectuées sous MEB, où les cellules cultivées sur ces échafaudages « nm » semblent prospérer sur une surface qui peut ressembler à une surface plane, comme dans le cas des plaques de culture TCPS. Les cellules cultivées sur ces échafaudages « nm » modérément greffés émettent des projections de leur cytoplasme dans toutes les directions (pseudopodes) attestant de l'effet positif de ces deux conditions de greffage sur l'adhésion, l'étalement et la morphologie des fibroblastes.

Sur les échafaudages « μm » greffés Th 1 h – Oz 20 min et UV direct 1 h (respectivement Fig. 86. b. e.), les fibroblastes sont bien étalés et présentent une morphologie fusiforme avec un ou des axes d'élongation propre à chaque cellule. Comme il a été expliqué plus haut, lors de l'analyse de la morphologie des fibroblastes sur ces échafaudages « μm » modérément greffés, les cellules suivent la direction des fibres micrométriques auxquelles elles s'attachent. La structure tridimensionnelle de ces échafaudages pousse les cellules à adhérer et à s'étaler en suivant l'axe des fibres.

Par ailleurs, sur ces échafaudages « μm » et « nm » greffés Th 1 h – Oz 20 min et UV direct 1 h, nous pouvons clairement observer l'excellente distribution des cellules sur l'ensemble de la surface. Celles-ci prolifèrent et se rejoignent pour former des tapis cellulaires. Ces résultats viennent conforter les observations faites au MEB.

L'examen de la morphologie cellulaire a montré que la morphologie cellulaire des fibroblastes était clairement différente si les cellules étaient ensemencées sur des échafaudages non greffés ou sur des échafaudages greffés polyNaSS. Cependant, le taux de groupements sulfonates doit être modéré pour avoir une morphologie optimale.

Il a déjà été démontré que l'orientation des fibres était essentielle pour la migration cellulaire. Des fibres électrofilées alignées ont amélioré la migration cellulaire le long de la direction de l'alignement des fibres par rapport aux fibres aléatoires [117-118]. Malgré le fait que les échafaudages utilisés dans cette étude soient issus d'une déposition aléatoire des fibres, nous pouvons observer une structure uniforme pour les échafaudages « μm », avec des fibres tendues, ce qui a conduit à un étalement cellulaire le long des fibres PCL, ce qui peut être comparé au comportement des cellules sur des échafaudages en fibres électrofilées alignées.

5.3.2.2.2 Analyse quantitative :

Toujours en utilisant le logiciel « ImageJ », nous avons effectué des mesures de la longueur des cellules. Ces mesures ont été réalisées sur un minimum de 10 cellules pour chaque condition testée.

Les résultats sont rapportés dans le Tableau 32 et la Figure 87.

Tableau 32 : Valeurs de la longueur cellulaire en fonction de l'échafaudage et de la condition de greffage.

		Longueur cellulaire (μm)	
		μm	nm
Témoin	Non traité	45.19 \pm 12.21	35.63 \pm 11.25
Greffés	Th 1 h - Oz 20 min	86.32 \pm 24.11	82.77 \pm 06.67
	Th 3 h - Oz 20 min	40.79 \pm 04.02	44.59 \pm 04.60
	UV 1 h - Oz 20 min	41.72 \pm 13.94	42.25 \pm 11.99
	UV direct 1 h	100.23 \pm 07.54	88.48 \pm 05.51

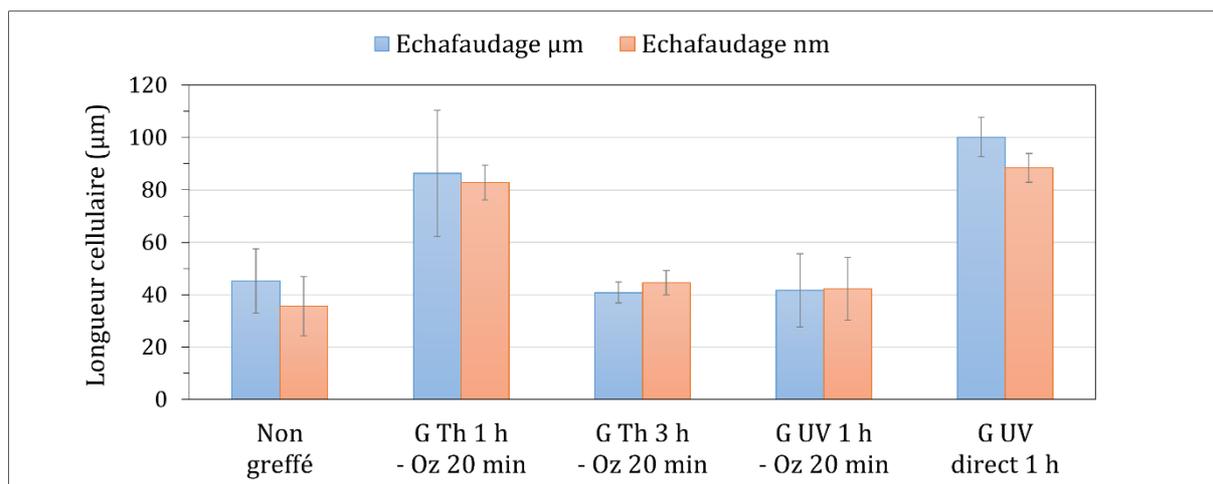


Figure 87 : Comparaison de la longueur cellulaire en fonction de l'échafaudage et de la condition de greffage.

Nous avons observé que longueur cellulaire était clairement différente en fonction de la condition de greffage. Les cellules les moins longues sont retrouvées sur les échafaudages non greffés, mais aussi sur les échafaudages à très haut de greffage (G Th 3h – Oz 20 min et G UV 1 h – Oz 20 min). La longueur des cellules cultivées sur les échantillons non greffés et les échantillons présentant une surface super hydrophile est pratiquement la même. En comparant les deux échafaudages entre eux, nous n'avons pas observé de différence en termes de longueur cellulaire.

Les cellules cultivées sur les échantillons modérément greffés (G Th 1 h – Oz 20 min et G UV direct 1 h), sont très longues par rapport aux autres conditions. En effet, la longueur moyenne¹⁴ des cellules cultivées sur les échantillons non greffés était de $40.40 \pm 6.76 \mu\text{m}$ et $42.33 \pm 1.62 \mu\text{m}$ sur les échantillons à très haut de greffage (super hydrophile), alors que sur les échantillons greffés Th 1 h – Oz 20 min, la longueur moyenne était égale à $84.54 \pm 2.5 \mu\text{m}$ ce qui représente une augmentation de 53 % par rapport aux échantillons non greffés. Sur les échantillons greffés UV direct 1 h, la longueur moyenne était de $94.35 \pm 8.31 \mu\text{m}$ (+ 59 % par rapport aux échantillons non greffés). Il paraît alors que l'étalement est facilité par la présence des groupements sulfonates du polymère polyNaSS greffé, en quantité modérée.

¹⁴ La longueur moyenne est calculée entre les deux types d'échafaudages à chaque condition de greffage.

Des résultats similaires, en ce qui concerne l'effet du polyNaSS greffé sur l'augmentation de l'étalement cellulaire, ont été observés lorsque le polyNaSS a été greffé sur des faisceaux de fibres PCL [273].

Il est intéressant de noter que le greffage direct sous irradiation UV (G UV direct) a permis d'avoir le meilleur étalement cellulaire. Pour les cellules cultivées sur les échafaudages « μm » greffés UV direct 1 h, la longueur des cellules était de $100.23 \pm 7.54 \mu\text{m}$, en d'autres termes, les cellules ont adopté la forme la plus allongée quand elles ont été cultivées sur ces échantillons.

5.3.3 Prolifération cellulaire :

Pour finir avec l'étude de la réponse cellulaire, nous avons étudié la prolifération des fibroblastes lorsqu'ils ont étéensemencés sur les échafaudages non greffés et greffés. La prolifération cellulaire après des temps d'incubation de 2, 4 et 7 jours a été appréciée en utilisant le test MTT.

Le test de prolifération cellulaire avec le MTT mesure le taux de prolifération cellulaire et, inversement, lorsque des événements biochimiques entraînent l'apoptose ou la nécrose, la réduction de la viabilité cellulaire.

Sur chaque condition testée, l'absorbance du MTT comme indicateur de la viabilité et/ou l'activité cellulaire est relevée, ce qui permet d'obtenir une valeur de quantification précise des changements dans les taux de prolifération cellulaire. Les résultats d'absorbance obtenus pour les différents échafaudages en fonction des conditions de greffage sont présentés dans la Figure 88.

L'évolution des valeurs de l'absorbance, équivalent à un nombre de cellules, est différente en fonction de la condition de greffage. Les résultats à 2 jours ont montré que les cellules, que ce soit sur les échantillons greffés ou non greffés, ont soutenu une prolifération constante à des niveaux équivalents, avec une très légère augmentation observée sur les échafaudages greffés. Ces résultats sont compatibles avec ceux de la cytotoxicité à 2 jours.

A partir de 4 jours, nous pouvons remarquer des tendances qui se dégagent. En effet, les échafaudages non greffés présentent une prolifération cellulaire inférieure à celle des échafaudages greffés, ce qui n'a pas été surprenant puisque les échafaudages greffés

présentent une surface hydrophile connue pour être plus apte à favoriser la prolifération cellulaire.

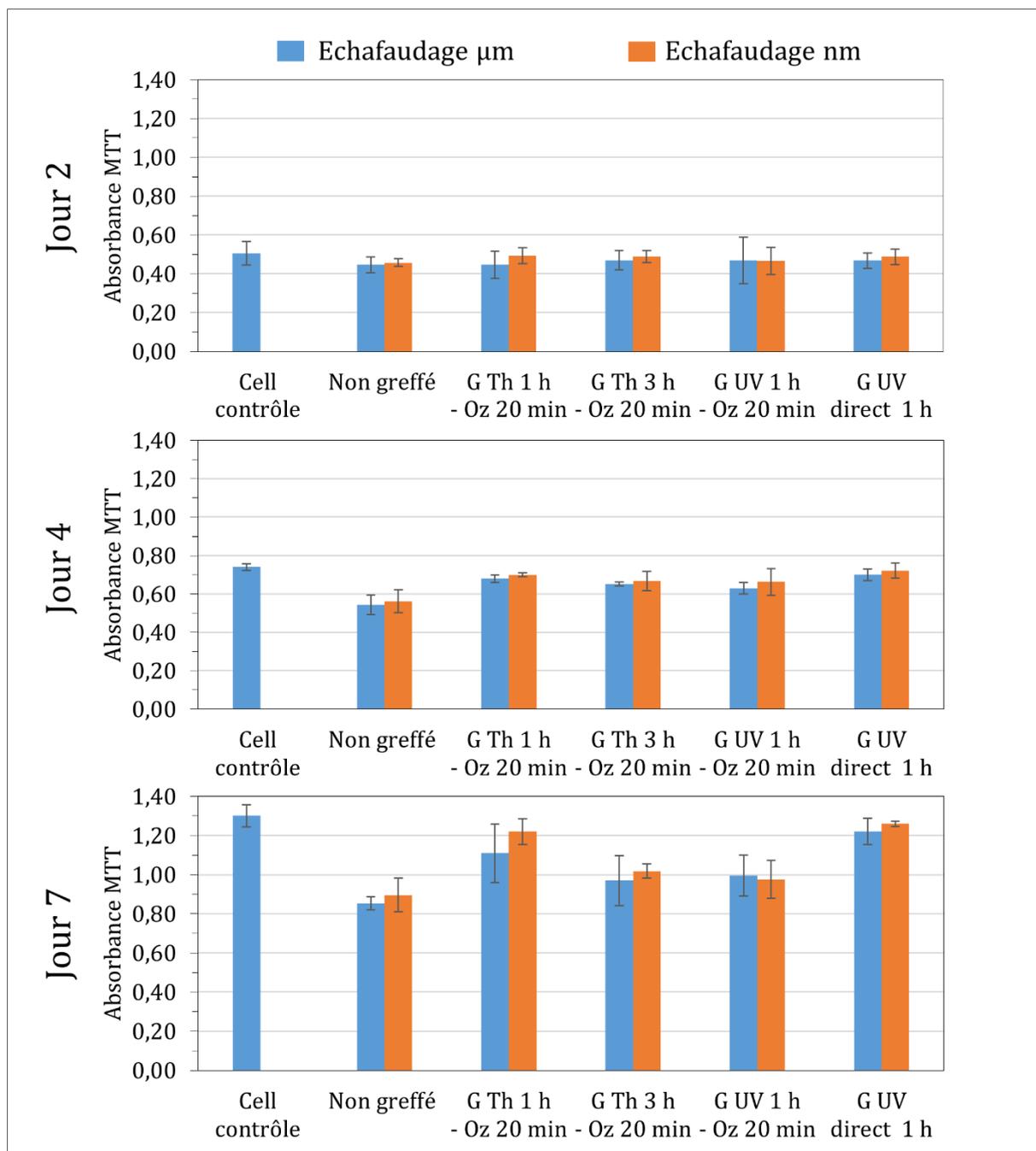


Figure 88 : Prolifération cellulaire des fibroblastes L929 sur des échafaudages greffées et non greffées, mesurée par essai MTT effectué à 2, 4 et 7 jours (les données sont basées sur des échantillons en trois exemplaires de chaque condition pris à chacune des 3 durée d'incubation).

Les échantillons avec un taux de groupements sulfonates modéré présentent une légère augmentation par rapport aux autres échantillons greffés à très haut taux de greffage. En effet, à 7 jours, les différences de prolifération sont clairement observables.

Les valeurs d'absorbances augmentent considérablement à partir du jour 4, pour les deux échafaudages traduisant ainsi une augmentation de l'activité métabolique de la population cellulaire pouvant s'interpréter par une prolifération cellulaire.

Les échafaudages modérément greffés (G Th 1 h – Oz 20 min et G UV direct 1 h) semblent être le meilleur support pour la prolifération puisque les valeurs d'absorbance sont toujours plus importantes que pour les autres conditions de greffage. Deux hypothèses peuvent expliquer ce fait : les fibres alignées permettent une plus grande prolifération cellulaire et/ou l'alignement des fibres stimule plus le métabolisme des cellules.

Les observations effectuées en MEB avaient déjà apporté des preuves de la prolifération cellulaire puisque, plus le temps de culture était grand, plus la surface des échafaudages étaient recouvertes d'un tapis cellulaire comme le montre les Figures 83 et 85. Cependant, contrairement à nos attentes, il n'y a pas une très grande variation de la prolifération cellulaire entre les deux échafaudages « μm » et « nm ».

En effet, les valeurs sont très proches même si nous pouvons noter une très légère augmentation pour les échafaudages « nm ». Une hypothèse pourrait expliquer ce fait : sur la surface plane des échafaudages « nm », les cellules nécessitent moins de temps pour s'adapter à cette structure, tandis que pour les échafaudages « μm » avec leur structure tridimensionnelle, les cellules prennent plus de temps.

Pour interpréter ces résultats et pour pouvoir expliquer les effets observés du greffage de polyNaSS avec différents taux, concernant l'adhérence, l'étalement, la morphologie et la prolifération cellulaire, nous pouvons nous référer aux travaux de Bacakova. L *et al.* (2011) [336] qui ont révélé que l'adhésion et la prolifération des cellules sont optimales sur des matériaux à mouillabilité modérée.

En effet, à la surface d'un biomatériau polymère, les groupements contenant de l'oxygène augmentent la composante polaire de l'énergie libre de surface du polymère, rendant cette surface plus mouillable, plus adhésive et plus susceptible à l'adsorption des protéines de la MEC médiatrices de l'adhésion, par exemple la vitronectine, la fibronectine, le collagène ou la laminine. En même temps, l'adsorption des molécules cellulaires non adhésives, comme l'albumine, est atténuée car ces molécules préfèrent se lier à des surfaces moins oxygénées et plus hydrophobes [335]. D'un autre côté, même si

sur certains matériaux hydrophiles, la quantité absolue de molécules de la MEC médiatrices de l'adhérence cellulaire était inférieure à celle de surfaces plus hydrophobes, les cellules ont adhéré en plus grand nombre à des matériaux plus hydrophiles et ont été réparties sur une plus grande surface [337].

Ces résultats s'expliquent par le fait que l'important n'est pas seulement la quantité absolue, mais aussi la conformation spatiale des molécules adsorbées qui agissent comme médiateurs de l'adhésion cellulaire. Sur des surfaces hydrophiles, ces molécules sont adsorbées sous une forme plus souple, ce qui permet leur réorganisation par les cellules et cela donne donc accès aux récepteurs d'adhésion cellulaire pour les motifs d'adhésion de ces molécules. De plus, sur ces surfaces hydrophiles, les protéines qui assurent l'adhésion sont adsorbées presque avec leur conformation physiologique, et sont bien reconnues par les récepteurs de l'adhésion cellulaire. La conformation spatiale des molécules adsorbées, médiatrices de l'adhésion cellulaire, joue un rôle primordial.

Cependant, il a également été démontré qu'un taux élevé de protéines adsorbées pourrait même être désavantageux pour l'adhésion cellulaire, en raison de la dénaturation des protéines [338]. Cette observation est particulièrement importante dans le cas de notre étude puisque nous avons non seulement comparé l'effet de surfaces hydrophobes et hydrophiles, mais aussi des surfaces super hydrophiles qui présentent un angle de contact de 0°.

En effet, Keselowsky *et al.* (2003) [338], ont rapporté qu'une adhésion cellulaire optimale ne se produit que sur des surfaces modérément hydrophiles. Ils ont démontré que sur des surfaces très hydrophiles, en particulier sur des surfaces super hydrophiles (angle de contact < 2°), la fixation et l'étalement des cellules sont limités ou complètement désactivés. Cette observation peut expliquer la raison pour laquelle, sur les échafaudages greffés polyNaSS présentant un angle de contact de 0° (G Th 3 h - Oz 20 min et G UV 1 h - Oz 20 min) les cellules étaient moins étalées et adhérentes de ce fait aux fibres de l'échafaudage sur un nombre inférieur de sites d'adhésion. Ce phénomène est visible sur les micrographies prises pour ces surfaces super-hydrophiles, notamment les échafaudages « μm » et « nm » G UV 1 h - Oz 20 min au jour 4 (Fig. 83).

Par ailleurs, des études antérieures réalisées dans notre laboratoire ont démontré que la modulation du comportement cellulaire est autant influencée par la composition

chimique de la surface exposée aux protéines médiatrices de l'adhésion et aux cellules que par les propriétés hydrophiles de la surface [272,275]. Les groupements sulfonates du polymère polyNaSS greffé peuvent stimuler l'adhésion cellulaire et activer la prolifération cellulaire grâce à la capacité des groupements sulfonates à permettre la modulation de l'adsorption des protéines adhésives et la modulation de la conformation de celles-ci.

F. El Khadali *et al.* (2002) [296], ont démontré que sur les surfaces de biomatériaux greffés polyNaSS, le paramètre le plus important est le rapport et la distribution des groupements ioniques dans les sites actifs.

De plus, Rohman *et al.* (2015) [272], ont rapporté que le polyNaSS greffé grâce à sa charge négative ; fournie par la localisation des fonctions sulfonates sur le cycle aromatique polyNaSS, contribue à une meilleure réponse cellulaire des fibroblastes. Ils ont démontré, même si l'étude a été réalisée sur un autre type de surface PCL (à savoir des films PCL), que sur une surface présentant une teneur en groupements sulfonates modérée, c'est-à-dire avec un taux de greffage moyen (et automatiquement un caractère hydrophile modéré) la prolifération cellulaire est améliorée. A partir de là, une hypothèse a été formulée selon laquelle il n'est pas nécessaire de développer des surfaces PCL greffées avec un taux de greffage polyNaSS élevé afin de favoriser la réponse cellulaire.

Les résultats de cette étude ont confirmé ces résultats obtenus précédemment concernant l'amélioration de la réponse cellulaire obtenue sur les surfaces greffées en polyNaSS et démontrent l'effet positif du greffage de polyNaSS sur la réponse fibroblastique même sur une surface à architecture complexe comme un échafaudage biodégradable formé par un réseau de fibres PCL électrofilées. De plus, nous avons démontré qu'un taux de greffage modéré peut avoir des effets très favorables sur la réponse cellulaire.

5.3.4 Evaluation de la pénétration/infiltration cellulaire :

Pour évaluer la pénétration/infiltration cellulaire sur la profondeur ou l'épaisseur des deux types d'échafaudages, nous avons réalisé, en même temps que les observations classiques au microscope à fluorescence, des images selon l'axe Z ; à savoir sur la profondeur des échafaudages.

Cette technique est appelée « Z-stacking » (Fig. 89) et permet une analyse de l'échantillon sur une certaine profondeur. Les données recueillies à partir d'une série de coupes optiques imagées à intervalles courts et réguliers le long de l'axe Z sont utilisées pour créer une reconstruction 3D, ou comme dans notre étude, pour apprécier la pénétration cellulaire le long de l'axe Z représentant la profondeur ou épaisseur de l'échantillon.

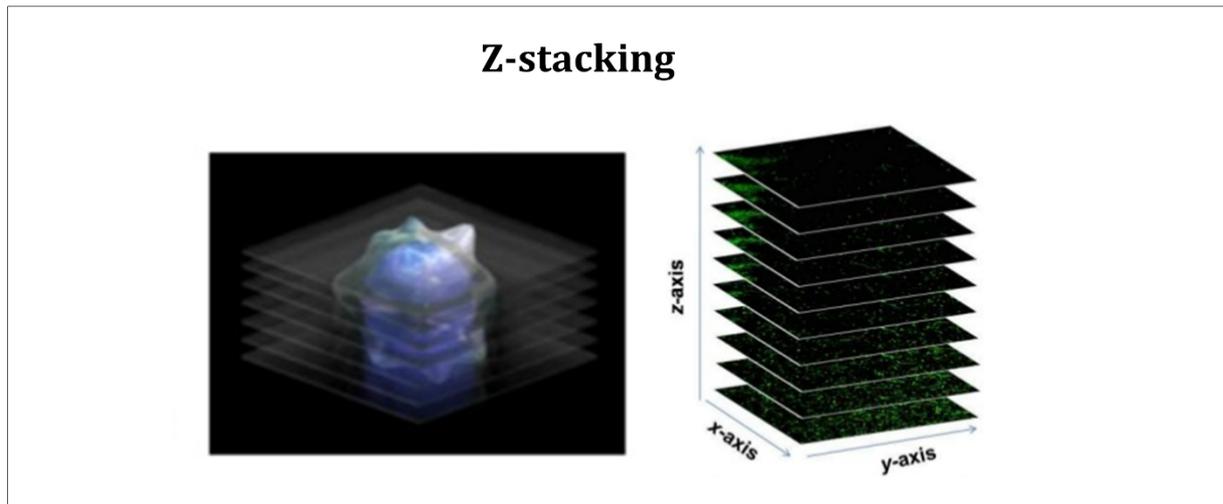


Figure 89 : Représentation de la technique du « Z-stacking » en microscopie à fluorescence.

Notre stratégie consiste à repérer les plans sur lesquels se trouvent certaines cellules en analysant plusieurs coupes optiques d'images effectuée à 3 jours. Si les cellules se trouvent toutes sur le même plan, c'est qu'il n'y a pas eu d'infiltration sur la profondeur, et si au contraire nous avons des cellules sur plusieurs plans (selon l'axe Z) différents, cela voudrait dire que les cellules se sont infiltrées à travers le réseau fibrillaire.

Pour ce faire, nous avons analysé des coupes effectuées sur les deux échafaudages « μm » et « nm », tous deux greffés UV direct 1 h, qui ont présenté les meilleurs résultats cellulaires jusqu'à présent. Les images de ces coupes pour les deux échantillons analysés sont présentées dans la Figure 90 pour l'échafaudage « μm » et dans la Figure 91 pour l'échafaudage « nm ». Chaque coupe ou chaque image représente une épaisseur de $2\ \mu\text{m}$, donc plus nous avons d'images entre le moment où les premières cellules commencent à apparaître et le moment où les dernières cellules ne sont plus visibles, plus les cellules se sont retrouvées sur des plans différents de la surface, ce qui reviendrait à dire que plus elles sont visibles sur les dernières coupes, plus elles se sont infiltrées.

En analysant les images, nous pouvons observer que pour l'échafaudage « μm » greffés UV direct 1 h (Fig. 90), les cellules sont visibles sur 20 coupes, ce qui veut dire que pour arriver à bien voir les cellules situées en profondeur, le microscope a effectué 20 coupes. Sachant que chaque coupe mesure 2 μm , nous pouvons donc déduire que les cellules ont été détectées et bien présentes sur 40 μm d'épaisseur. Cela représenterait une infiltration cellulaire sur 40 μm au bout de juste 3 jours d'incubation sur cet échafaudage.

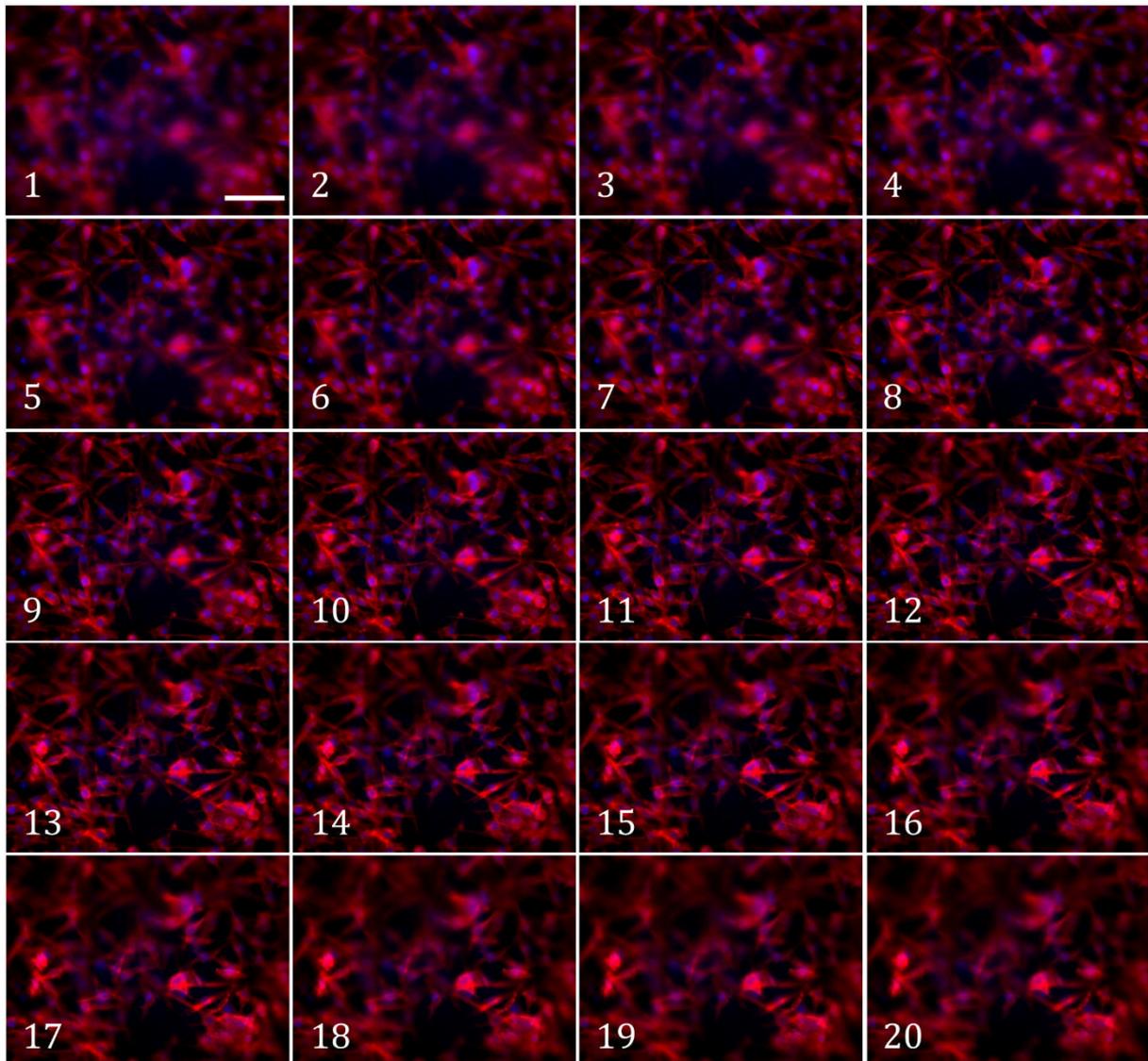


Figure 90 : Images, prises avec la technique « Z-stacking », de fibroblastes L929 après 72 h d'incubation sur l'échafaudage « μm » greffé UV direct 1 h. L'épaisseur de chaque coupe ou image est égale à 2 μm . La barre d'échelle représente 100 μm et peut être appliquée sur toutes les images.

Lorsque nous analysons les images prises avec la même technique pour l'échafaudage « nm » greffé UV direct 1 h (Fig. 91), nous pouvons très vite nous rendre compte du

nombre limité d'images prises pour ce type d'échafaudage. En effet, sur cet échafaudage, 6 coupes ou images ont suffi à observer le moment où les cellules commencent à apparaître à l'écran et le moment où elles en disparaissent. Cela veut dire que les fibroblastes sur cet échafaudage, ne sont présents que sur 12 μm . Ce résultat confirme ainsi que la structure de cet échafaudage constitué de fibres nanométriques formant des pores très étroits empêcherait les cellules d'aller en profondeur sur l'épaisseur de l'échafaudage.

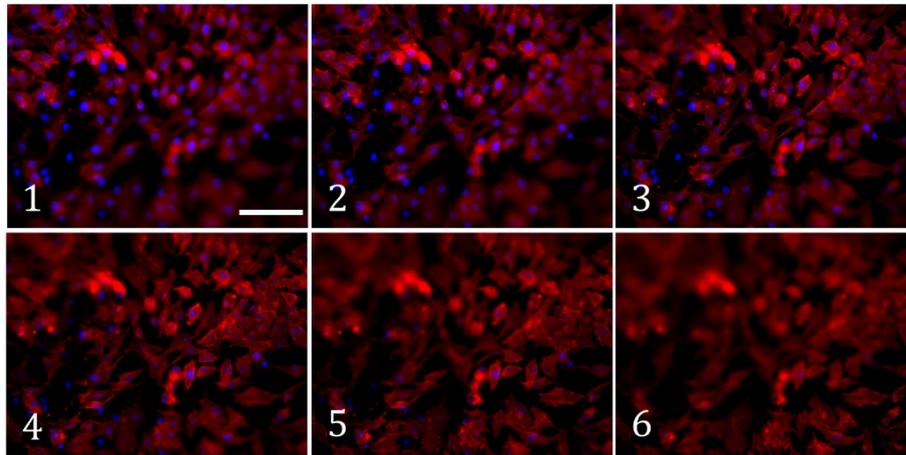


Figure 91 : Images, prises avec la technique « Z-stacking », de fibroblastes L929 après 72 h d'incubation sur l'échafaudage « nm » greffé UV direct 1 h. L'épaisseur de chaque coupe ou image est égale à 2 μm . La barre d'échelle représente 100 μm et peut être appliquée sur toutes les images.

Pour résumé, alors que les fibroblastes peuvent être aperçus sur 40 μm de profondeur sur les échafaudages « μm », ils ne sont détectables que sur 12 μm sur l'autre type d'échafaudage « nm ». L'infiltration/pénétration cellulaire sur les échafaudages « μm » est donc 4 x supérieur à celle sur les échafaudages « nm ». Les cellules peuvent donc pénétrer en profondeur sur l'échafaudage « μm » greffé UV direct 1 h, pendant que sur l'échafaudage « nm », les cellules sont bloquées en surface.

Tout comme il a été possible d'observer les cellules infiltrées sur l'épaisseur de l'échafaudage « μm » sous MEB (Fig. 84), ces résultats confirment la possibilité pour les cellules de pénétrer à travers le réseau fibrillaire de cet échafaudage.

Ura. DP *et al.* (2019) [329] ont eu des résultats similaires en comparant des fibres nanométriques avec des fibres micrométriques. Sur les échantillons à base de nanofibres, la distance entre les fibres limitait la pénétration des cellules dans l'échafaudage, alors

qu'avec un diamètre des fibres d'environ de 3.5 μm , comme dans notre étude (diamètre moyen des fibres = $3.28 \pm 0.3 \mu\text{m}$), une bonne géométrie et un espacement suffisant sont fournis pour la migration des cellules à travers la structure de l'échafaudage 3D, qui a été déclenchée par l'attachement des pseudopodes aux fibres situées sur des plans profonds (Fig. 84). De plus, les nanofibres facilitent une plus grande dispersion des cellules à leur surface, par rapport aux microfibrilles, où les pseudopodes cellulaires peuvent atteindre les fibres plus profondément dans le réseau électrofilé.

Ainsi, la structure de l'échafaudage bicouche, conçu pour une application en RTG/ROG, permettrait d'avoir une bonne pénétration cellulaire (surtout pour les ostéoblastes) sur la face de l'échafaudage en regard de l'os (échafaudage « μm »), tandis que les cellules épithéliales resteront bloquées et dispersées à la surface sur l'échafaudage « nm » en regard des tissus gingivaux.

5.4 Conclusion :

Ce travail a permis le développement d'un échafaudage bicouche en fibres PCL électrofilées pouvant être appliqué en régénération tissulaire/osseuse guidée du parodonte. Il a été montré que les propriétés mécaniques de ces échafaudages bicouches peuvent être ajustées. Leur comportement mécanique hybride permet une bonne résistance à la traction et une grande flexibilité. La biocompatibilité *in vitro*, de ces échafaudages fonctionnalisés par greffage covalent de polyNaSS, a été démontrée.

Ces scaffolds bicouche répondent au cahier des charges défini dans la partie introductive du 5^{ème} chapitre. Ils sont en effet biocompatibles, biodégradables et possèdent une porosité élevée et interconnectée sur la face en regard de l'os, tout en permettant un blocage en surface des cellules épithéliales. Les propriétés mécaniques sont améliorées par rapport à un échafaudage simple.

L'étude *in vitro* a permis de montrer une meilleure adhérence, un meilleur étalement et une plus grande prolifération cellulaire, avec une meilleure couverture de la surface de l'échafaudage par les fibroblastes lorsqu'ils sontensemencés sur des échafaudages en fibre PCL modérément greffés avec du polyNaSS.

Le polymère bioactif « polyNaSS » greffé module efficacement la réponse cellulaire lorsqu'il est présent en quantité modérée sur la surface des échafaudages. Les résultats

ont montré que la méthode de greffage UV direct 1 h, avec un procédé très simple, permettant de modérer la quantité de groupements sulfonates et l'hydrophilie de surface présente un intérêt considérable pour développer des échafaudages en fibres PCL bioactifs et biodégradables qui peuvent être utilisés en ingénierie tissulaire, notamment en RTG/ROG.

Conclusion générale

Même si le potentiel des fibres polymère électrofilées est très prometteur et d'un grand intérêt, généralement, la mise en œuvre est limitée en raison de l'absence de sites réactifs appropriés. La modification des fibres électrofilées s'est alors révélée être une stratégie flexible pour introduire des caractéristiques supplémentaires et améliorées sur les fibres vierges. De nombreuses applications utiles des fibres électrofilées, notamment en ingénierie tissulaire, bénéficieraient grandement d'une modification de surface appropriée et/ou d'une fonctionnalisation ultérieure. Un effort considérable est consacré à la modification des fibres électrofilées dans le but d'adapter leurs propriétés telles que l'hydrophilie/hydrophobie, les propriétés mécaniques, la résistance, la stabilité, la distribution et taille des pores, l'adhérence cellulaire, la prolifération et la cytocompatibilité.

Les stratégies de modification pré-électrofilage présentent encore de nombreux inconvénients. Par conséquent, la modification post-électrofilage, permettant de fonctionnaliser la surface des fibres de différentes manières, est la plus largement acceptée. Cependant, bien que de nombreuses études traitent de ce sujet, il n'y a jusqu'à aujourd'hui, que peu d'applications cliniques en raison des limitations rencontrées. La plupart des techniques présentent des recherches incomplètes sur les paramètres de traitement, avec une grande complexité des installations et de la conception technologique.

Notre approche dans ce travail de thèse a été différente. La technique de greffage covalent, sous irradiation UV, de polymères bioactifs, est développée au laboratoire LBPS depuis plusieurs années, et est conçue pour rendre plus facile, efficace et reproductible, mais surtout applicable en industrie, la fonctionnalisation de surfaces de biomatériaux.

L'objectif de cette étude était de développer et d'évaluer des échafaudages biodégradables en fibres PCL électrofilées, possédant différentes microstructures.

Nous avons commencé par mettre au point le greffage covalent, sous irradiations UV, de polymères bioactifs sur des surfaces PCL. L'électrofilage, que nous avons développé au laboratoire, nous a permis la fabrication d'échafaudages en fibres PCL. Une étude de cas a été utile pour déterminer les conditions adéquates pour la déposition de fibres possédant

des diamètres nanométriques mais aussi micrométriques. Les échafaudages élaborés sont par la suite fonctionnalisés en appliquant les conditions dûment définies. De plus, des études ont été réalisées afin d'étudier l'impact des différents traitements utilisés lors du processus de greffage, sur l'évolution des propriétés intrinsèques mais aussi mécaniques des différents échafaudages, qui ont démontré qu'en fonction du processus de greffage utilisé, les propriétés étaient modifiées ou non.

Des études préliminaires de la dégradation ont été menées, et ont mis en évidence, que la vitesse de dégradation pouvait être plus ou moins ajustée pour correspondre à l'application visée. La dégradation des échafaudages a montré la perte progressive des propriétés mécaniques pour certaines des techniques utilisées lors du greffage.

Par la suite, nous avons imaginé/conçu puis élaboré un échafaudage hybride bicouche pour une application en ingénierie tissulaire, plus précisément, en régénération tissulaire/osseuse guidée du parodonte. La conception de cet échafaudage bicouche en fibres PCL électrofilées a permis l'obtention d'une structure à la fois flexible et résistante à la traction.

Nous avons procédé à une évaluation biologique *in vitro* qui a montré que la réponse cellulaire pouvait être favorablement modulée grâce au greffage du polymère bioactif polyNaSS à la surface de ces échafaudages. L'étude *in vitro* a montré la meilleure adhérence, étalement, prolifération et une plus grande couverture de la surface des échafaudages par les fibroblastes lorsqu'ils sontensemencés sur des surfaces modérément greffés. Le polyNaSS a en effet modulé efficacement et favorablement la réponse cellulaire lorsqu'il a été présent en quantité modérée.

Cette étude a aussi mis en évidence que la méthode de greffage UV direct 1 h, avec un procédé très simple, facilement industrialisable et permettant de modérer la quantité de groupements sulfonates, présente réel un intérêt pour développer des échafaudages bioactifs et biodégradables pour l'ingénierie tissulaire. Cette technique permet d'améliorer considérablement la réponse biologique, tout en gardant l'intégrité structurelle et mécanique des structures.

En conclusion, ces échafaudages en fibres PCL bioactifs et biodégradables greffés avec du polyNaSS pourraient être sérieusement considérés dans la prochaine génération d'échafaudages synthétiques bioactifs. Je pense notamment à une application en

RTG/ROG pour l'échafaudage en fibres PCL bicouche. De plus, chaque échafaudage pourrait trouver son application, en fonction du tissu à remplacer ou de la fonction à remplir. Le laboratoire envisage des applications pour le traitement du Spina Bifida ou la réparation du cartilage. Quel que soit l'application à viser, ces échafaudages en fibres PCL électrofilées pourraient très bien être adaptés en fonction d'un cahier des charges qui pourrait différer d'une application à une autre, d'un tissu à un autre.

Perspectives

Les travaux présentés dans ce projet de thèse ont exploré plusieurs axes ; à savoir l'étude du matériau, la chimie, la biomécanique mais aussi la biologie. Néanmoins, plusieurs aspects de ces travaux nécessitent d'être explorés et approfondis.

Tout d'abord, revenant à l'objectif principal dans lequel s'inscrivent les travaux de cette thèse, qui est le greffage de polymère bioactifs à la surface d'échafaudages en fibres PCL électrofilées. Bien que le greffage d'un polymère bioactif porteur de groupements sulfonates ait été étudié en détail, le temps imparti à la thèse n'a pas permis d'évaluer de manière claire la possibilité de fonctionnaliser ces échafaudages par d'autres polymères bioactifs porteurs de groupements carboxylates et phosphonates.

En effet, des études préliminaires sur le greffage d'un polymère bioactif porteur de groupements carboxylate, l'Hydroxyéthyl Méthacrylate (HEMA), sous irradiations UV, ont conduit à l'obtention d'hydrogels à base de fibres PCL électrofilées. Un autre polymère, mimant le polyNaSS, mais portant des groupements phosphonates a aussi été testé. A mon sens, les prochains travaux devraient s'orienter vers la modification de surface avec ces polymères afin d'évaluer leur potentiel d'application en ingénierie tissulaire.

Par ailleurs, les études de la dégradation ainsi que des propriétés intrinsèques du matériau n'ont pas été très poussées, puisqu'elles ont consisté uniquement à étudier les échafaudages présentant des fibres micrométriques.

D'autres campagnes d'essais mécaniques, comme la compression ou le cisaillement, pourrait être envisagées afin de comprendre au mieux le comportement mécaniques de ces échafaudages ainsi que l'effet des différents traitements.

Le dispositif d'électrofilage est en cours d'amélioration, afin de pouvoir produire d'autres structures électrofilées plus élaborées, comme des fibres alignées, et ainsi comparer avec les aspects de cette étude réalisée exclusivement sur des fibres aléatoires.

D'autres études avec d'autres types de cellules (ostéoblastes, PDL, HUVEC...) devraient être menées afin d'étudier la réponse cellulaire en détail ; différenciation, phénotype, minéralisation... et saisir avec précision les différents « potentiels » domaines d'application de ces échafaudages fonctionnalisés.

Références bibliographiques

- [1] Zeleny J. The electrical discharge from liquid points, and a hydrostatic method of measuring the electric intensity at their surfaces. *Phys Rev* 1914;3: 69–91.
- [2] Formhals, A., Process and apparatus for preparing artificial threads. U.S. Patent No. 1, 975, 504, 1934.
- [3] Taylor GI. Electrically Driven Jets. *Proc R Soc Lond, A Math Phys Sci*, (1934–1990), 1969: 313, 453–75.
- [4] Hunley MT, Long TE. Electrospinning functional nanoscale fibers: a perspective for the future. *Polym Int* 2008;57: 385–9.
- [5] Reneker DH, Yarin AL, Fong H, Koombhongse S. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *J Appl Phys* 2000;87: 4531–47.
- [6] Subbiah T, Bhat GS, Tock RW, Parameswaran S, Ramkumar SS. Electrospinning of nanofibers. *J Appl Polym Sci* 2005;96: 557–69.
- [7] Ramakrishna S, Fujihara K, Teo WE, Yong T, Ma Z, Ramaseshan R. Electrospun nanofibers: solving global issues. *Mater Today* 2006;9: 40–50.
- [8] Luu YK, Kim K, Hsiao BS, Chu B, Hadjiargyrou M. Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers. *J Control Release* 2003;89: 341–53.
- [9] Cui W, Zhou S, Li X, Weng J. Drug-loaded biodegradable polymeric nanofibers prepared by electrospinning. *Tissue Eng* 2006;12: 1070.
- [10] Wu Y, He JH, Xu L, Yu JY. Electrospinning drug-loaded poly (Butylenes Succinate-cobythylene Terephthalate) (PBST) with acetylsalicylic acid (aspirin). *Int J Electrospun Nanofibers Appl* 2007;1: 1–6.
- [11] Barnes CP, Sell SA, Knapp DC, Walpoth BH, Brand DD, Bowlin GL. Preliminary investigation of electrospun collagen and polydioxanone for vascular tissue engineering applications. *Int J Electrospun Nanofibers Appl* 2007;1: 73–87.
- [12] Welle A, Kroger M, Doring M, Niederer K, Pindel E, Chronakis S. Electrospun aliphatic polycarbonates as tailored tissue scaffold materials. *Biomaterials* 2007;28: 2211–9.
- [13] Chong EJ, Phan TT, Lim IJ, Zhang YZ, Bay BH, Ramakrishna S, et al. Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. *Acta Mater* 2007;3: 321–30.
- [14] Yang F, Murugan R, Wang S, Ramakrishna S. Electrospinning of nano/micro scale poly (L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials* 2005;26: 2603–10.
- [15] Stankus JJ, Guan J, Wagner WR. Fabrication of biodegradable elastomeric scaffolds with sub-micron morphologies. *J Biomed Mater Res* 2004;70A: 603–14.
- [16] Ohgo K, Zhao C, Kobayashi M, Asakura T. Preparation of non-woven nanofibers for Bombyx mori silk, Samia cythia ricini silk and recombinant hybrid silk with electrospinning method. *Polymer* 2003;44: 841–6.
- [17] Alessandrino A, Marelli B, Arosio C, Fare S, Tanzi MC, Freddi G. Electrospun silk fibroin mats for tissue engineering. *Eng Life Sci* 2008;8: 219–25.
- [18] Matthews JA, Wnek GE, Simpson DG, Bowlin GL. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules* 2002;3: 232–8.
- [19] Um IC, Fang DF, Hsiao BS, Okamoto A, Chu B. Electro-spinning and electro-blowing of hyaluronic acid. *Biomacromolecules* 2004;5: 1428–36.
- [20] Ma ZW, Kotaki M, Ramakrishna S. Electrospun cellulose nanofiber as affinity membrane. *J Membr Sci* 2005;265: 115–23.
- [21] Chen Z, Mo X, Qing F. Electrospinning of collagen–chitosan complex. *Mater Lett* 2007;61: 3490–4.
- [22] Chew SY, Wen Y, Dzenis Y, Leong KW. The role of electrospinning in the emerging field of nanomedicine. *Curr Pharm Des* 2006;12: 4751–70.
- [23] Kidoaki S, Kwon IK, Matsuda T. Mesoscopic spatial designs of nano and microfiber meshes for tissue-engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques. *Biomaterials* 2005;26: 37–46.
- [24] Zhang C, Yuan X, Wu L, Han Y, Sheng J. Study on morphology of electrospun poly (vinyl alcohol) mats. *Eur Polym J* 2005;41: 423–32.

- [25] Zhang YZ, Venugopal J, Huang ZM, Lim CT, Ramakrishna S. Characterization of the surface biocompatibility of the electrospun PCL-collagen nanofibers using fibroblasts. *Biomacromolecules* 2005;6: 2583–9.
- [26] Nam J, Huang Y, Agarwal S, Lannutti J. Improved cellular infiltration in electrospun fiber via engineered porosity. *Tissue Eng* 2007;13: 2249–57.
- [27] Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospun poly (ϵ -caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. *Biomacromolecules* 2006;7: 2796–805.
- [28] Stankus JJ, Guan J, Fujimoto K, Wagner WR. Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix. *Biomaterials* 2006;27: 735–44.
- [29] Sill TJ, Recum HAV. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 2008;29: 1989–2006.
- [30] Adomaviciute E, Milasius Rimvydas. The influence of applied voltage on poly (vinyl alcohol) (PVA) nanofibre diameter. *Fibers Text East Eur* 2007;15: 64–5.
- [31] Fang X, Reneker DH. DNA fibers by electrospinning. *J Macromol Sci Phys B* 1997;36: 169–73.
- [32] Son WK, Youk JH, Park WH. Preparation of ultrafine oxidized cellulose mats via electrospinning. *Biomacromolecules* 2004;5: 197–201.
- [33] Jiang HL, Fang DF, Hsiao BS, Chu B, Chen WL. Optimization and characterization of dextran membranes prepared by electrospinning. *Biomacromolecules* 2004;5: 326–33.
- [34] Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 1984;309: 30–3.
- [35] Li M, Mondrinos MJ, Gandhi MR, Ko FK, Weiss AS, Lelkes PI. Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials* 2005;26: 5999–6008.
- [36] Li J, He A, Zheng J, Han CC. Gelatin and gelatin-hyaluronic acid nanofibrous membranes produced by electrospinning of their aqueous solutions. *Biomacromolecules* 2006;7: 2243–7.
- [37] Li C, Vepari C, Jin HJ, Kim HJ, Kaplan DL. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27: 3115–24.
- [38] Zhang Y, Ouyang H, Lim CT, Ramakrishna S, Huang ZM. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;72: 156–65.
- [39] Zhang YZ, Venugopal J, Huang ZM, Lim CT, Ramakrishna S. Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers. *Polymer* 2006;47: 2911–7.
- [40] Zhong S, Teo WE, Zhu X, Beuerman RW, Ramakrishna S, Yung LYL. An aligned nanofibrous collagen scaffold by electrospinning and its effects on in vitro fibroblast culture. *J Biomed Mater Res A* 2006;79A: 456–63.
- [41] Zeugolis DI, Khew ST, Yew ESY, Ekaputra AK, Tong YW, Yung LYL, et al. Electro-spinning of pure collagen nano-fibres — just an expensive way to make gelatin?. *Biomaterials* 2008;29: 2293–305.
- [42] Yang L, Fitie CFC, Werf KOV, Bennink ML, Dijkstra PJ, Feijen J. Mechanical properties of single electrospun collagen type I fibers. *Biomaterials* 2008;29: 955–62.
- [43] Neal RA, McClugage III SG, Link MC, Sefcik LS, Ogle RC, Botchwey EA. Laminin nanofiber meshes that mimic morphological properties and bioactivity of basement membranes. *Tissue Eng Part C* 2008;15: 11–21.
- [44] Hakkarainen M. Aliphatic polyesters: abiotic and biotic degradation and degradation products. *Adv Polym Sci* 2002;157: 113–38.
- [45] Li WJ, Laurencin CT, Catterson EJ, Tuan RS, Ko FK. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2002;60: 613–21.
- [46] Xu CY, Inai R, Kotaki M, Ramakrishna S. Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering. *Biomaterials* 2004;25: 877–86.
- [47] Wang M, Hsieh AJ, Rutledge GC. Electrospinning of poly (MMA-co-MAA) copolymers and their layered silicate nanocomposites for improved thermal properties. *Polymer* 2005;46: 3407–18.
- [48] Mckee MG, Wilkes GL, Colby RH, Long TE. Correlations of solution rheology with electrospun fiber formation of linear and branched polyesters. *Macromolecules* 2004;37: 1760–7.
- [49] Ki CS, Baek DH, Gang KD, Lee KH, Um IC, Park YH. Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution. *Polymer* 2005;46: 5094–102.
- [50] Haghi AK, Akbari M. Trends in electrospinning of natural nanofibers. *Phys Status Solidi* 2007;204: 1830–4.

- [51] Sukigara S, Gandhi M, Ayutsede J, Micklus M, Ko F. Regeneration of Bombyx mori silk by electrospinning—part 1: processing parameters and geometric properties. *Polymer* 2003;44: 5721–7.
- [52] Deitzel JM, Kleinmeyer J, Harris D, Tan NCB. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer* 2001;42: 261–72.
- [53] Tan SH, Inai R, Kotaki M, Ramakrishna S. Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process. *Polymer* 2005;46: 6128–34.
- [54] McKee MG, Layman JM, Cashion MP, Long TE. Phospholipid non-woven electrospin membranes. *Science* 2006;311: 353–5.
- [55] W Burger C, Hsiao BS, Chu B. Nanofibrous marterials and their applications. *Annu Rev Mater Res* 2006;36: 333–68.
- [56] Fong H, Chun I, Reneker DH. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer* 1999;40: 4585–92.
- [57] Kim KH, Jeong L, Park HN, Shin SY, Park WH, Lee SC, et al. Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration. *J Biotechnol* 2005;120: 327–39.
- [58] Son WK, Youk JH, Lee TS, ParkWH. The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly (ethylene oxide) fibers. *Polymer* 2004;45: 2959–66.
- [59] Gupta P, Elkins C, Long TE, Wilkes GL. Electrospinning of linear homopolymers of poly (methylmethacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent. *Polymer* 2005;46: 4799–810.
- [60] Jarusuwannapoom T, Hongroijanawiwat W, Jitjaicham S, Wannatong L, Nithitanakul M, Pattamaprom C, et al. Effect of solvents on electro-spinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of resulting electrospun polystyrene fibers. *Eur Polym J* 2005;41: 409–21.
- [61] Hohman MM, Shin M, Rutledge G, Brenner MP. Electrospinning and electrically forced jets. II. Applications. *Phys Fluids* 2001;13: 2221–36.
- [62] Zong X, Kim K, Fang D, Ran S, Hsiao BS, Chu B. Structure and process relationship of electrospun bioadsorbable nanofiber membrane. *Polymer* 2002;43: 4403–12.
- [63] Baumgarten PK. Electrostatic spinning of acrylic microfibers. *J Colloid Interface Sci* 1971;36: 71–9.
- [64] Reneker DH, Chun L. Nanometre diameters of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology* 1996;7: 216–23.
- [65] Yordem OS, Papila M, Menceloğlu YZ. Effects of electrospinning parameters on polyacrylonitrile nanofiber diameter: an investigation by response surface methodology. *Mater Des* 2008;29: 34–44.
- [66] Laudenslager MJ, Sigmund W M. “Electrospinning” *Encyclopedia of Nanotechnology*. Springer Publishers 2012: 769–775.
- [67] Yuan XY, Zhang YY, Dong CH, Sheng J. Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning. *Polym Int* 2004;53: 1704–10.
- [68] Wang X, Um IC, Fang D, Okamoto A, Hsiao BS, Chu B. Formation of water-resistant hyaluronic acid nanofibers by blowing-assisted electro-spinning and non-toxic post treatments. *Polymer* 2005;46: 4853–67.
- [69] Sundaray B, Subramanian V, Natarajan TS, Xiang RZ, Chang CC, Fann WS. Electrospinning of continuous aligned polymer fibers. *Appl Phys Lett* 2004;84: 1222–4.
- [70] Li D, Wang Y, Xia Y. Electrospinning nanofibers as uniaxially aligned arrays and layer-by-layer stacked films. *Adv Mater* 2004;16: 361–6.
- [71] Ki CS, Kim JW, Hyun JH, Lee KH, Hattori M, Rah DK, et al. Electrospun three dimensional silk fibroin nanofibrous scaffold. *J Appl Polym Sci* 2007;106: 3922–8.
- [72] Kumbar SG, Nukavarapu SP, James R, Hogan MV, Laurencin CT. Recent patents on electrospun biomedical nanostructures: an overview. *Biomed Eng* 2008;1: 68–78.
- [73] Doshi J, Reneker DH. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *J Electrost* 1995;35: 151–6.
- [74] Lee JS, Choi KH, Ghim HD, Kim SS, Chun DH, Kim HY, et al. Role of molecular weight of a tactic poly (vinyl alcohol) (PVA) in the structure and properties of PVA nanofabric prepared by electrospinning. *J Appl Polym Sci* 2004;93: 1638–46.
- [75] Geng X, Kwon OH, Jang J. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials* 2005;26: 5427–32.
- [76] Buchko CJ, Chen LC, Shen Y, Martin DC. Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. *Polymer* 1999;40: 7397–407.

- [77] Jalili R, Morshed M, Abdolkarim S, Ravandi H. Fundamental parameters affecting electrospinning of PAN nanofibers as uniaxially aligned fibers. *J Appl Polym Sci* 2006;101: 4350–7.
- [78] Tong HW, Wang M, Electrospinning of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) fibrous scaffolds for tissue engineering applications: effects of electrospinning parameters and solution properties, *J. Macromol. Sci. Part B* 2011;50: 1535–1558.
- [79] Huan S, Liu G, Han G, Cheng W, Fu Z, Wu Q, Wang Q. Effect of experimental parameters on morphological, mechanical and hydrophobic properties of electrospun polystyrene fibers. *Materials* 2015;8:5: 2718.
- [80] Pelipenko J, Kristl J, Jankovic B, Baumgartner S, Kocbek P. The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers. *Int. J. Pharm.* 2013;456:1: 125–134.
- [81] De Vrieze S, Van Camp T, Nelvig A, Hagstrom B, Westbroek P, De Clerck K. The effect of temperature and humidity on electrospinning. *J. Mater. Sci.* 2009;44: 1357–1362.
- [82] Casper CL, Stephens JS, Tassi NG, Chase DB, Rabolt JF. Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process. *Macromolecules* 2004;37: 573–8.
- [83] Bae HS, Haider A, Selim KMK, Kang DY, Kim EJ, Kang IK. Fabrication of highly porous PMMA electrospun fibers and their application in the removal of phenol and iodine. *J. Polym. Res.* 2013;20: 7:1–7.
- [84] Zhang Y, Qian J, Ke Z, Zhu X, Bi H, Nie K. Viscometric study of poly (vinyl chloride)/poly (vinyl acetate) blends in various solvents. *Eur Polym J* 2002;38: 333–7.
- [85] Veleirinho B, Rei MF, Lopes-da-Silva JA. Solvent and concentration effects on the properties of electrospun poly (ethylene terephthalate) nanofiber mats. *J Polym Sci, B Polym Phys* 2008;46: 460–71.
- [86] Ohkawa K, Kim H, Lee K, Yamamoto H. Electrospun non-woven fabrics of poly(ecaprolactone) and their biodegradation by pure cultures of soil filamentous fungi. *Macromol Symp* 2004;216: 301–6.
- [87] Bhattarai SR, Bhattarai N, Yi HK, Hwang PH, Cha DI, Kim HY. Novel biodegradable electrospun membrane: scaffold for tissue engineering. *Biomaterials* 2004;25: 2595–602.
- [88] Lannutti J, Reneker D, Ma T, Tomasko D, Farson D. Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Mater Sci Eng C* 2007;27: 504–509.
- [89] Canbolat MF, Tang C, Bernacki SH. Mammalian cell viability in electrospun composite nanofiber structures. *Macromol Biosci* 2011;11: 1346–1356.
- [90] Nam J, Huang Y, Agarwal S. Materials selection and residual solvent retention in biodegradable electrospun fibers. *J Appl Polym Sci* 2008 :107: 1547–1554.
- [91] Weldon CB, Tsui JH, Shankarappa SA. Electrospun drug-eluting sutures for local anesthesia. *J Control Release* 2012;161: 903–909.
- [92] Martins A, Araujo JV, Reis RL. Electrospun nanostructured scaffolds for tissue engineering applications. *Nanomedicine* 2007;2: 929–942.
- [93] Chen JP, Chen SH, Lai GJ. Preparation and characterization of biomimetic silk fibroin/chitosan composite nanofibers by electrospinning for osteoblasts culture. *Nanoscale Res Lett* 2012;6: 1–11.
- [94] Chen S, Li R, Li X, Xie J. Electrospinning: An enabling nanotechnology platform for drug delivery and regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2018 :132 : 188–213.
- [95] Yu DG, Li XY, Wang X, Yang JH, Bligh SW, Williams GR. Nanofibers fabricated using triaxial electrospinning as zero order drug delivery systems. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2015;7: 18891–18897.
- [96] Han D, Yu X, Chai Q, Ayres N, Steckl AJ. Stimuli-responsive self-immolative polymer nanofiber membranes formed by coaxial electrospinning. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2017;9: 11858–11865.
- [97] Cho K, Lee HJ, Han SW, Min JH, Park H, Koh WG, Multi-compartmental hydrogel microparticles fabricated by combination of sequential electrospinning and photopatterning. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015;54: 11511–11515.
- [98] Bonani W, Motta A, Migliaresi C, Tan W. Biomolecule gradient in micropatterned nanofibrous scaffold for spatiotemporal release. *Langmuir* 2012;28: 13675–13687.
- [99] Samorezov JE, Alsberg E. Spatial regulation of controlled bioactive factor delivery for bone tissue engineering, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015;84: 45–67.
- [100] Zhang D, Ni N, Chen J, Yao Q, Shen B, Zhang Y. Electrospun SF/PLCL nanofibrous membrane: a potential scaffold for retinal progenitor cell proliferation and differentiation, *Sci. Rep.* 2015;5: 14326.

- [101] Merkle VM, Tran PL, Hutchinson M, Ammann KR, DeCook K, Wu X. Coreshell PVA/gelatin electrospun nanofibers promote human umbilical vein endothelial cell and smooth muscle cell proliferation and migration. *Acta Biomater.* 2015;27: 77–87.
- [102] Kim IL, Khetan S, Baker BM, Chen CS, Burdick JA. Fibrous hyaluronic acid hydrogels that direct MSC chondrogenesis through mechanical and adhesive cues. *Biomaterials* 2013;34: 5571–5580.
- [103] Grafahrend D, Heffels KH, Beer MV, Gasteier P, Möller M, Boehm G. Degradable polyester scaffolds with controlled surface chemistry combining minimal protein adsorption with specific bioactivation. *Nat. Mater.* 2011;10: 67–73.
- [104] Borjigin M, Strouse B, Niamat RA, Bialk P, Eskridge C, Xie J. Proliferation of genetically modified human cells on electrospun nanofiber scaffolds. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2012;1: e59.
- [105] Chua KN, Chai C, Lee PC, Tang YN, Ramakrishna S, Leong KW. Surface aminated electrospun nanofibers enhance adhesion and expansion of human umbilical cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Biomaterials* 2006;27: 6043–6051.
- [106] Kuo YC, Hung SC, Hsu SH. The effect of elastic biodegradable polyurethane electrospun nanofibers on the differentiation of mesenchymal stem cells. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 2014;122: 414–422.
- [107] Olvera D, Sathy BN, Carroll SF, Kelly DJ. Modulating microfibrillar alignment and growth factor stimulation to regulate mesenchymal stem cell differentiation. *Acta Biomater.* 2017;64: 148–160.
- [108] Yin Z, Chen X, Song HX, Hu JJ, Tang QM, Zhu T. Electrospun scaffolds for multiple tissues regeneration in vivo through topography dependent induction of lineage specific differentiation. *Biomaterials* 2015;44: 173–185.
- [109] Nam J, Johnson J, Lannutti JJ, Agarwal S. Modulation of embryonic mesenchymal progenitor cell differentiation via control over pure mechanical modulus in electrospun nanofibers, *Acta Biomater.* 7 (2011) 1516–1524.
- [110] Subramony SD, Dargis BR, Castillo M, Azeloglu EU, Tracey MS, Su A. The guidance of stem cell differentiation by substrate alignment and mechanical stimulation. *Biomaterials* 2013;34: 1942–1953.
- [111] Li N, Zhang Q, Gao S, Song Q, Huang R, Wang L. Three-dimensional graphene foam as a biocompatible and conductive scaffold for neural stem cells. *Sci. Rep.* 2013;3: 1604.
- [112] Balint R, Cassidy NJ, Cartmell SH. Conductive polymers: towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta Biomater.* 2014;10: 2341–2353.
- [113] Dong R, Zhao X, Guo, Ma PX. Biocompatible elastic conductive films significantly enhanced myogenic differentiation of myoblast for skeletal muscle regeneration. *Biomacromolecules* 2017;18: 2808–2819.
- [114] Binan L, Tendey C, De Crescenzo G, EL Ayoubi R, Aji A, Jolicoeur M. Differentiation of neuronal stem cells into motor neurons using electrospun poly-L-lactic acid/gelatin scaffold. *Biomaterials* 2014;35: 664–674.
- [115] Man Z, Yin L, Shao Z, Zhang X, Hu X, Zhu J. The effects of co-delivery of BMSC-affinity peptide and rhTGF-beta1 from coaxial electrospun scaffolds on chondrogenic differentiation. *Biomaterials* 2014;35: 5250–5260.
- [116] Stroka KM, Gu Z, Sun SX, Konstantopoulos K. Bioengineering paradigms for cell migration in confined microenvironments. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2014;30: 41–50.
- [117] Zuidema JM, Hyzinski-Garcia MC, Van Vlasselaer K, Zaccor NW, Plopper GE, Mongin AA. Enhanced GLT-1 mediated glutamate uptake and migration of primary astrocytes directed by fibronectin-coated electrospun poly-L-lactic acid fibers. *Biomaterials* 2014;35: 1439–1449.
- [118] Wang HB, Mullins ME, Cregg JM, McCarthy CW, Gilbert RJ. Varying the diameter of aligned electrospun fibers alters neurite outgrowth and Schwann cell migration. *Acta Biomater.* 2010;6: 2970–2978.
- [119] Yao S, Liu X, Yu S, Wang X, Zhang S, Wu Q. Co-effects of matrix low elasticity and aligned topography on stem cell neurogenic differentiation and rapid neurite outgrowth. *Nanoscale* 2016;8: 10252–10265.
- [120] Du J, Liu J, Yao S, Mao H, Peng J, Sun X. Prompt peripheral nerve regeneration induced by a hierarchically aligned fibrin nanofiber hydrogel. *Acta Biomater.* 2017;55: 296–309.
- [121] Xie J, MacEwan MR, Ray WZ, Liu W, Siewe DY, Xia Y. Radially aligned, electrospun nanofibers as dural substitutes for wound closure and tissue regeneration applications. *ACS Nano* 2010;4: 5027–5036.
- [122] Estabridis HM, Jana A, Nain A, Odde DJ. Cell migration in 1D and 2D nanofiber microenvironments. *Ann. Biomed. Eng.* 2017: 1–12.
- [123] Rao SS, Nelson MT, Xue R, DeJesus JK, Viapiano MS, Lannutti JJ. Mimicking white matter tract topography using core-shell electrospun nanofibers to examine migration of malignant brain tumors. *Biomaterials* 2013;34: 5181–5190.

- [124] Phipps MC, Xu Y, Bellis SL. Delivery of platelet-derived growth factor as a chemotactic factor for mesenchymal stem cells by bone-mimetic electrospun scaffolds. *PLoS One* 2012;7: e40831.
- [125] Patel S, Kurpinski K, Quigley R, Gao H, Hsiao BS, Ming Poo MM. Bioactive nanofibers: synergistic effects of nanotopography and chemical signaling on cell guidance, *Nano Lett.* 2007;7: 2122–2128.
- [126] Rodriguez LL, Schneider IC. Directed cell migration in multi-cue environments. *Integr. Biol.* 2013;5: 1306–1323.
- [127] Li X, Li M, Sun J, Zhuang Y, Shi J, Guan D. Radially aligned electrospun fibers with continuous gradient of SDF1 α for the guidance of neural stem cells. *Small* 2016;12: 5009–5018.
- [128] Fu K, Pack DW, Klivanov AM, Langer R. Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA) microspheres. *Pharm. Res.* 2000;17: 100–106.
- [129] Hinderer S, Layland SL, Schenke-Layland K. ECM and ECM-like materials – biomaterials for applications in regenerative medicine and cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016;97: 260–269.
- [130] Ji W, Yang F, Seyednejad H, Chen Z, Hennink WE, Anderson JM, Van den Beucken JJJ, Jansen JA. Biocompatibility and degradation characteristics of PLGA based electrospun nanofibrous scaffolds with nanoapatite incorporation. *Biomaterials* 2012;33: 6604–6614.
- [131] Chen XL, Liang X, Sun L, Wang F, Liu S, Wang YJ. Microskin autografting in the treatment of burns over 70% of total body surface area: 14 years of clinical experience. *Burns* 2011;37: 973–980.
- [132] Bottcher-Haberzeth S, Biedermann T, Reichmann E. Tissue engineering of skin. *Burns* 2010;36: 450–460.
- [133] Rnjak-Kovacina J, Wise SG, Li Z, Maitz PK, Young CJ, Wang Y. Tailoring the porosity and pore size of electrospun synthetic human elastin scaffolds for dermal tissue engineering. *Biomaterials* 2011;32: 6729–6736.
- [134] Rnjak-Kovacina J, Wise SG, Li Z, Maitz PK, Young CJ, Wang Y. Electrospun synthetic human elastin: collagen composite scaffolds for dermal tissue engineering. *Acta Biomater.* 2012;8: 3714–3722.
- [135] Chen S, Liu B, Carlson MA, Gombart AF, Reilly DA, Xie J. Recent advances in electrospun nanofibers for wound healing. *Nanomedicine* 2017;12.
- [136] Sheikh FA, Ju HW, Lee JM, Moon BM, Park HJ, Lee OJ. 3D electrospun silk fibroin nanofibers for fabrication of artificial skin. *Nanomedicine* 2015;11: 681–691.
- [137] Fu L, Xie J, Carlson MA, Reilly DA, Three-dimensional nanofiber scaffolds with arrayed holes for engineering skin tissue constructs. *MRS Commun.* 2017;7: 361–366.
- [138] MacNeil S. Biomaterials for tissue engineering of skin. *Mater. Today* 2008 ;11: 26–35.
- [139] Planz V, Lehr CM, Windbergs M. In vitro models for evaluating safety and efficacy of novel technologies for skin drug delivery. *J. Control. Release* 2016;242: 89–104.
- [140] Tamayol A, Hassani Najafabadi A, Mostafalu P, Yetisen AK, Commotto M, Aldahri M. Biodegradable elastic nanofibrous platforms with integrated flexible heaters for on-demand drug delivery. *Sci. Rep.* 2017;7: 9220.
- [141] Xie J, MacEwan MR, Schwartz AG, Xia Y. Electrospun nanofibers for neural tissue engineering. *Nanoscale* 2010;2: 35–44.
- [142] Xie J, Liu W, MacEwan MR, Bridgman PC, Xia Y. Neurite outgrowth on electrospun nanofibers with uniaxial alignment: the effects of fiber density, surface coating, and supporting substrate. *ACS Nano* 2014;8: 1878–1885.
- [143] Xie J, MacEwan MR, Willerth SM, Li X, Moran DW, Sakiyama-Elbert SE. Conductive core-sheath nanofibers and their potential application in neural tissue engineering. *Adv. Funct. Mater.* 2009;19: 2312–2318.
- [144] Xie J, MacEwan MR, Liu W, Jesuraj N, Li X, Hunter D. Nerve guidance conduits based on double-layered scaffolds of electrospun nanofibers for repairing the peripheral nervous system. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2014;6: 9472–9480.
- [145] Hurtado A, Cregg JM, Wang HB, Wendell DF, Oudega M, Gilbert RJ. Robust CNS regeneration after complete spinal cord transection using aligned poly-L-lactic acid microfibers. *Biomaterials* 2011;32: 6068–6079.
- [146] Wang TY, Forsythe JS, Nisbet DR, Parish CL. Promoting engraftment of transplanted neural stem cells/progenitors using biofunctionalised electrospun scaffolds. *Biomaterials* 2012;33: 9188–9197.
- [147] Carlson AL, Bennett NK, Francis NL, Halikere A, Clarke S, Moore JC. Generation and transplantation of reprogrammed human neurons in the brain using 3D microtopographic scaffolds. *Nat. Commun.* 2016;7: 10862.

- [148] Laflamme MA, Murry CE. Regenerating the heart. *Nat. Biotechnol.* 2005;23: 845–856. Han F, Jia X, Dai D, Yang X, Zhao J, Zhao Y. Performance of a multilayered small-diameter vascular scaffold dual-loaded with VEGF and PDGF. *Biomaterials* 2013;34: 7302–7313.
- [149] Zhao G, Zhang X, Lu TJ, Xu F. Recent advances in electrospun nanofibrous scaffolds for cardiac tissue engineering. *Adv. Funct. Mater.* 2015;25: 5726–5738.
- [150] Pascual-Gil S, Garbayo E, Diaz-Herraez P, Prosper F, Blanco-Prieto MJ. Heart regeneration after myocardial infarction using synthetic biomaterials. *J. Control. Release* 2015;203: 23–38.
- [151] Kharaziha M, Nikkhah M, Shin SR, Annabi N, Masoumi N, Gaharwar AK. PGS: gelatin nanofibrous scaffolds with tunable mechanical and structural properties for engineering cardiac tissues. *Biomaterials* 2013;34: 6355–6366.
- [152] Wu S, Duan B, Qin X, Butcher JT. Living nano-micro fibrous woven fabric/hydrogel composite scaffolds for heart valve engineering. *Acta Biomater.* 2017;51: 89–100.
- [153] Kai D, Wang QL, Wang HJ, Prabhakaran MP, Zhang Y, Tan YZ. Stem cell-loaded nanofibrous patch promotes the regeneration of infarcted myocardium with functional improvement in rat model. *Acta Biomater.* 2014;10: 2727–2738.
- [154] Hsiao CW, Bai MY, Chang Y, Chung MF, Lee TY, Wu CT. Electrical coupling of isolated cardiomyocyte clusters grown on aligned conductive nanofibrous meshes for their synchronized beating. *Biomaterials* 2013;34: 1063–1072.
- [155] Feiner R, Engel L, Fleischer S, Malki M, Gal I, Shapira A. Engineered hybrid cardiac patches with multifunctional electronics for online monitoring and regulation of tissue function. *Nat. Mater.* 2016;150: 679–685.
- [156] Huey DJ, Hu JC, Athanasiou KA. Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive. *Science* 2012;338: 917–921.
- [157] Makris EA, Gomoll AH, Malizos KN, Hu JC, Athanasiou KA. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2015;11: 21–34.
- [158] Keeney M, Lai JH, Yang F. Recent progress in cartilage tissue engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2011;22: 734–740.
- [159] Mollon B, Kandel R, Chahal J, Theodoropoulos J. The clinical status of cartilage tissue regeneration in humans. *Osteoarthr. Cartil.* 2013;21: 1824–1833.
- [160] Klein TJ, Malda J, Sah RL, Hutmacher DW. Tissue engineering of articular cartilage with biomimetic zones. *Tissue Eng. B Rev.* 2009;15: 143–157.
- [161] Coburn J, Gibson M, Bandalini PA, Laird C, Mao HQ, Moroni L. Biomimetics of the extracellular matrix: an integrated three-dimensional fiber-hydrogel composite for cartilage tissue engineering. *Smart Struct. Syst.* 2011;7: 213–222.
- [162] Xu T, Binder KW, Albanna MZ, Dice D, Zhao W, Yoo JJ. Hybrid printing of mechanically and biologically improved constructs for cartilage tissue engineering applications. *Biofabrication* 2013;5: 015001.
- [163] Reboredo JW, Weigel T, Steinert A, Rackwitz L, Rudert M, Walles H. Investigation of migration and differentiation of human mesenchymal stem cells on five layered collagenous electrospun scaffold mimicking native cartilage structure. *Adv. Healthc. Mater.* 2016;5: 2191–2198.
- [164] Chen W, Chen S, Morsi Y, El-Hamshary H, El-Newhy M, Fan C. Superabsorbent 3D scaffold based on electrospun nanofibers for cartilage tissue engineering. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2016;8: 24415–24425.
- [165] Yang G, Rothrauff BB, Tuan RS. Tendon and ligament regeneration and repair: clinical relevance and developmental paradigm. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 2013;99: 203–222.
- [166] Weinreb JH, Sheth C, Apostolakos J, McCarthy MB, Barden B, Cote MP. Tendon structure, disease, and imaging. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014;4: 66–73.
- [167] Orr SB, Chainani A, Hippensteel KJ, Kishan A, Gilchrist C, Garrigues NW. Aligned multilayered electrospun scaffolds for rotator cuff tendon tissue engineering. *Acta Biomater.* 2015;24: 117–126.
- [168] Franchi M, Raspanti M, Dell'Orbo C, Quaranta M, De Pasquale V, Ottani V. Different crimp patterns in collagen fibrils relate to the subfibrillar arrangement. *Connect. Tissue Res.* 2009;49: 85–91.
- [169] Liu W, Lipner J, Moran CH, Feng L, Li X, Thomopoulos S. Generation of electrospun nanofibers with controllable degrees of crimping through a simple, plasticizer-based treatment. *Adv. Mater.* 2015;27: 2583–2588.
- [170] Chen F, Hayami JW, Amsden BG. Electrospun poly(L-lactide-co-acryloyl carbonate) fiber scaffolds with a mechanically stable crimp structure for ligament tissue engineering. *Biomacromolecules* 2014;15: 1593–1601.

- [171] Wu S, Wang Y, Streubel PN, Duan B. Living nanofiber yarn-based woven biotextiles for tendon tissue engineering using cell tri-culture and mechanical stimulation. *Acta Biomater.* 2017;62: 102–115.
- [172] Zhang C, Yuan H, Liu H, Chen X, Lu P, Zhu T. Well-aligned chitosanbased ultrafine fibers committed teno-lineage differentiation of human induced pluripotent stem cells for Achilles tendon regeneration. *Biomaterials* 2015;53: 716–730.
- [173] Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 2012 :40 : 363–408.
- [174] Pina S, Oliveira JM, Reis RL. Natural-based nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: a review. *Adv. Mater.* 2015;27: 1143–1169.
- [175] Stevens MM, George JH. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science* 2005;310: 1135–1138.
- [176] Phipps MC, Clem WC, Grunda JM, Clines GA, Bellis SL. Increasing the pore sizes of bone-mimetic electrospun scaffolds comprised of polycaprolactone, collagen I and hydroxyapatite to enhance cell infiltration. *Biomaterials* 2012;33: 524–534.
- [177] Li X, Xie J, Yuan X, Xia Y. Coating electrospun poly(ϵ -caprolactone) fibers with gelatin and calcium phosphate and their use as biomimetic scaffolds for bone tissue engineering. *Langmuir* 2008;24: 14145–14150.
- [178] Liu W, Yeh YC, Lipner J, Xie J, Sung HW, Thomopoulos S. Enhancing the stiffness of electrospun nanofiber scaffolds with a controlled surface coating and mineralization. *Langmuir* 2011;27: 9088–9093.
- [179] Xie J, Zhong S, Ma B, Shuler FD, Lim CT. Controlled biomineralization of electrospun poly(ϵ -caprolactone) fibers to enhance their mechanical properties. *Acta Biomater.* 2013;9: 5698–5707.
- [180] Xie J, Blough ER, Wang CH. Submicron bioactive glass tubes for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2012;8: 811–819.
- [181] Weng L, Boda SK, Teusink MJ, Shuler FD, Li X, Xie J. Binary doping of strontium and copper enhancing osteogenesis and angiogenesis of bioactive glass nanofibers while suppressing osteoclast activity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2017;9: 24484–24496.
- [182] Lee YJ, Lee JH, Cho HJ, Kim HK, Yoon TR, Shin H. Electrospun fibers immobilized with bone forming peptide-1 derived from BMP7 for guided bone regeneration. *Biomaterials* 2013;34: 5059–5069.
- [183] Yao Q, Cosme JG, Xu T, Miszuk JM, Picciani PH, Fong H. Three dimensional electrospun PCL/PLA blend nanofibrous scaffolds with significantly improved stem cells osteogenic differentiation and cranial bone formation. *Biomaterials* 2017;115: 115–127.
- [184] James AW, LaChaud G, Shen J, Asatrian G, Nguyen V, Zhang X. A review of the clinical side effects of bone morphogenetic protein-2. *Tissue Eng. B Rev.* 2016;22: 284–297.
- [185] Zhu L, Dai J, Chen L, Chen J, Na H, Zhu J. Design and fabrication of imidazolium ion-immobilized electrospun polyurethane membranes with antibacterial activity. *J. Mater. Sci.* 2016;52: 2473–2483.
- [186] Kara HH, Xiao F, Sarker M, Jin TZ, Sousa AMM, Liu C. Antibacterial poly (lactic acid) (pla) films grafted with electrospun pla/allyl isothiocyanate fibers for food packaging. *J. Appl. Polym. Sci.* 2016;133: 726–736.
- [187] Cerkez I, Sezer A, Bhullar SK. Fabrication and characterization of electrospun poly(ϵ -caprolactone) fibrous membrane with antibacterial functionality. *R. Soc. open sci.* 2017;4: 160911.
- [188] Tijing LD, Woo YC, Yao M, Ren J, Shon HK. Electrospinning for Membrane Fabrication: Strategies and Applications. In: Drioli, E., Giorno, L., and Fontananova, E. (eds.), *Comprehensive Membrane Science and Engineering*, second edition. 2017: vol. 1: 418–444.
- [189] Park CH, Kim CH, Tijing LD, Lee DH, Yu MH, Pant HR, Kim Y, Kim CS. Preparation and characterization of (polyurethane/nylon-6) nanofiber/ (silicone) film composites via electrospinning and dip-coating. *Fibers and Polymers* 2012;13: 339-345.
- [190] Oh B, Lee CH. Advanced Cardiovascular Stent Coated with Nanofiber. *Molecular Pharmaceutics* 2013;10: 4432-4442.
- [191] Park CG, Kim MH, Park M, Lee JE, Lee SH, Park JH, Yoon KH, Bin Choy Y. Polymeric nanofiber coated esophageal stent for sustained delivery of an anticancer drug. *Macromolecular Research* 2011;19: 1210-1216.
- [192] Zafar M, Najeeb S, Khurshid Z, Vazirzadeh M, Zohaib S, Najeeb B, Sefat F. Potential of Electrospun Nanofibers for Biomedical and Dental Applications. *Materials* 2016;9: 73.
- [193] Damle S, Bhattal H, Loomba A. Apexification of anterior teeth: A comparative evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide paste. *J. Clin. Pediatr. Dent.* 2012;36: 263–268.

- [194] Odabas ME, Alacam A, Sillelioglu H, Devenci C. Clinical and radiographic success rates of mineral trioxide aggregate and ferric sulphate pulpotomies performed by dental students. *Eur. J. Paediatr. Dent.* 2012;13: 118–122.
- [195] Wang J, Ma H, Jin X. The effect of scaffold architecture on odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Biomaterials* 2011;31: 7822–7830.
- [196] Kim JJ, Bae WJ, Kim JM, Kim JJ, Lee EJ, Kim HW, Kim EC. Mineralized polycaprolactone nanofibrous matrix for odontogenesis of human dental pulp cells. *J. Biomater. Appl.* 2014;28: 1069–1078.
- [197] Bottino MC, Yassen GH, Platt JA, Labban N, Windsor LJ, Spolnik KJ, Bressiani AH. A novel three-dimensional scaffold for regenerative endodontics: Materials and biological characterizations. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2015;9: E116–E123.
- [198] Kim G, Asran AS, Michler GH, Simon P, Kim J. Electrospun PVA/HAp nanocomposite nanofibers: Biomimetics of mineralized hard tissues at a lower level of complexity. *Bioinspiration Biomim.* 2008;3: 046003.
- [199] Rizvi A, Zafar MS, Farid WM, Gazal G. Assessment of Antimicrobial Efficacy of MTAD, Sodium Hypochlorite, EDTA and Chlorhexidine for Endodontic Applications: An In vitro Study. *Middle East J. Sci. Res.* 2014;21: 353–357.
- [200] Bottino MC, Kamocki K, Yassen GH, Platt JA, Vail MM, Ehrlich Y, Spolnik KJ, Gregory RL. Bioactive nanofibrous scaffolds for regenerative endodontics. *J. Dent. Res.* 2013;92: 963–969.
- [201] Kim GH, Park YD, Lee SY. Odontogenic stimulation of human dental pulp cells with bioactive nanocomposite fiber. *Journal of Biomaterials Applications* 2015;29: 854–866.
- [202] Bae WJ, Min KS, Kim JJ, Kim JJ, Kim HW, Kim EC. Odontogenic responses of human dental pulp cells to collagen/nanobioactive glass nanocomposites. *Dental Materials* 2012;28: 1271–1279.
- [203] Yun HM, Lee ES, Kim MJ. Magnetic nanocomposite scaffold-induced stimulation of migration and odontogenesis of human dental pulp cells through integrin signaling pathways. *PLoS ONE* 2015;10:e0138614.
- [204] Feres M, Figueiredo LC, Soares GMS, Favari M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis. *Periodontology 2000.* 2015;67: 131–186.
- [205] Shang S, Yang F, Cheng X, Walboomers XF, Jansen JA. The effect of electrospun fiber alignment on the behaviour of rat periodontal ligament cells. *European Cells and Materials* 2010;19: 180–192.
- [206] Jiang W, Li L, Zhang D. Incorporation of aligned PCLPEG nanofibers into porous chitosan scaffolds improved the orientation of collagen fibers in regenerated periodontium. *Acta Biomaterialia* 2015;25: 240–252.
- [207] Inanc B, Arslan YE, Seker S, Elcin AE, Elcin YM. Periodontal ligament cellular structures engineered with electrospun poly(DL-lactide-co-glycolide) nanofibrous membrane scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2009;90: 186–195.
- [208] Park SH, Kim TI, Ku Y. Effect of hydroxyapatite coated nanofibrous membrane on the responses of human periodontal ligament fibroblast. *Journal of the Ceramic Society of Japan* 2008;116: 31–35.
- [209] Kumada Y, Zhang S. Significant type I and type III collagen production from human periodontal ligament fibroblasts in 3D peptide scaffolds without extra growth factors. *PLoS ONE* 2010;5: e10305.
- [210] Rodriguez-Lozano FJ, Garcia-Bernal D, Aznar-Cervantes S. Effects of composite films of silk fibroin and graphene oxide on the proliferation, cell viability and mesenchymal phenotype of periodontal ligament stem cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2014;25: 2731–2741.
- [211] Suganya S, Venugopal J, Ramakrishna S, Lakshmi BS, Dev VGR. Aloe vera/silk fibroin/hydroxyapatite incorporated electrospun nanofibrous scaffold for enhanced osteogenesis. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering* 2014;4: 9–19.
- [212] Davies GM, Bridgman C, Hough D, Davies R. The application of fluoride varnish in the prevention and control of dental caries. *Dent. Update* 2009;36: 410–412.
- [213] Ismail AI, Hasson H. Fluoride supplements, dental caries and fluorosis: A systematic review. *J. Am. Dent. Assoc.* 2008;139: 1457–1468.
- [214] Dionysopoulos D. The effect of fluoride-releasing restorative materials on inhibition of secondary caries formation. *Fluoride* 2014;47: 258–265.
- [215] Samprasit W, Kaomongkolgit R, Sukma, M, Rojanarata T, Ngawhirunpat T, Opanasopit, P. Mucoadhesive electrospun chitosan-based nanofibre mats for dental caries prevention. *Carbohydr. Polym.* 2015;117: 933–940.

- [216] Khurshid Z, Zafar M, Qasim S, Shahab S, Naseem M, AbuReqaiba A. Advances in Nanotechnology for Restorative Dentistry. *Materials* 2015;8: 717–731.
- [217] Najeeb S, Khurshid Z, Matinlinna JP, Siddiqui F, Nassani MZ, Baroudi K. Nanomodified Peek Dental Implants: Bioactive Composites and Surface Modification—A Review. *Int. J. Dent.* 2015: 381759.
- [218] Wang W, Ciselli P, Kuznetsov E, Peijs T, Barber AH. Effective reinforcement in carbon nanotube-polymer composites. *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.* 2008;366: 1613–1626.
- [219] Behler KD, Stravato A, Mochalin V, Korneva G, Yushin G, Gogotsi Y. Nanodiamond-polymer composite fibers and coatings. *ACS Nano* 2009;3: 363–369.
- [220] Demir MM, Horzum N, Tasdemirci A, Turan K, Güden M. Mechanical Interlocking between Porous Electrospun Polystyrene Fibers and an Epoxy Matrix. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2014;6: 21901–21905.
- [221] Borges AL, Münchow EA, de Oliveira SAC, Yoshida T, Vallittu PK, Bottino MC. Effect of random/aligned nylon-6/MWCNT fibers on dental resin composite reinforcement. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2015 :48: 134–144.
- [222] Lee MW, An S, Jo HS, Yoon SS, Yarin AL. Self-healing Nanofiber-Reinforced Polymer Composites: Tensile Testing and Recovery of Mechanical Properties. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2015;7: 19546–19554.
- [223] Albrektsson T, Brånemark P, Hansson H, Lindström J. Osseointegrated titanium implants: Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop.* 1981;52: 155–170.
- [224] Zembic A, Philipp AOH, Hämmerle CHF, Wohlwend, A.; Sailer, I. Eleven-Year Follow-Up of a Prospective Study of Zirconia Implant Abutments Supporting Single All-Ceramic Crowns in Anterior and Premolar Regions. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* 2015;17: e417–e426.
- [225] Javed F, Vohra F, Zafar S, Almas K. Significance of Osteogenic Surface Coatings on Implants to Enhance Osseointegration Under Osteoporotic-like Conditions. *Implant Dent.* 2014;23: 679–686.
- [226] Ravichandran R, Ng CC, Liao S, Pliszka D, Raghunath M, Ramakrishna S, Chan CK. Biomimetic surface modification of titanium surfaces for early cell capture by advanced electrospinning. *Biomed. Mater.* 2012 :7: 015001.
- [227] Ray SS, Chen SS, Li CW, Nguyen NC, Nguyen HT. A comprehensive review: electrospinning technique for fabrication and surface modification of membranes for water treatment application. *RSC Adv.* 2016;6: 85495–85514.
- [228] Sagitha P, Reshmi CR, Sundaran SP, Sujith A. Recent advances in post-modification strategies of polymeric electrospun membranes. *European Polymer Journal* 2018;105: 227–249.
- [229] Wasim M, Sabir A, Shafiq M, Islam A, Azam M, Jamil T. Mixed matrix membranes: Two step process modified with electrospun (carboxy methylcellulose sodium salt/sepiolite) fibers for nanofiltration, *J. Ind. Eng. Chem.* 2017;50: 172–182.
- [230] Correia DM, Ribeiro C, Sencadas V, Botelho G, Carabineiro SAC, Ribelles JLG, Mendez SL. Influence of oxygen plasma treatment parameters on poly(vinylidene fluoride) electrospun fiber mats wettability. *Prog. Org. Coat.* 2015;85: 151–158.
- [231] Gancarz I, Bryjak J, Pozniak G, Tylus W. Plasma modified polymers as a support for enzyme immobilization II. Amines plasma. *Eur. Polym. J.* 2003;39: 2217–2224.
- [232] Bolbasov EN, Antonova LV, Stankevich KS, Ashrafov A, Matveeva VG, Velikanova EA, Khodyrevskaya YI, Kudryavtseva YA, Anissimov YG, Tverdokhlebov SI, Barbarash LS. The use of magnetron sputtering for the deposition of thin titanium coatings on the surface of bioresorbable electrospun fibrous scaffolds for vascular tissue engineering: a pilot study. *Appl. Surf. Sci.* 2017;398: 63–72.
- [233] Sawawi M, Wang TY, Nisbet DR, Simon GP. Scission of electrospun polymer fibres by ultrasonication. *Polymer* 2013;54: 4237–4252.
- [234] Duque Sanchez L, Brack N, Postma A, Pigram PJ, Meagher L. Surface modification of electrospun fibres for biomedical applications: a focus on radical polymerization methods. *Biomaterials* 2016;106: 24–45.
- [235] Zhang J, Yuan Y, Shen J, Lin S. Synthesis and characterization of chitosan grafted poly(N, N-dimethyl-N-methacryloxyethyl-N-(3-sulfopropyl) ammonium) initiated by ceric (IV) ion. *Eur. Polym. J.* 2003;39: 847–850.
- [236] Wang J, Wang T, Li L, Wu P, Pan K, Cao B. Functionalization of polyacrylonitrile nanofiber using ATRP method for boric acid removal from aqueous solution. *J. Water Process Eng.* 2014;3: 98–104.
- [237] Oktay B, Demir S, Kayaman-Apohan N. Immobilization of α -amylase onto poly (glycidyl methacrylate) grafted electrospun fibers by ATRP. *Mater. Sci. Eng. C* 2015;50: 386–393.

- [238] Demirci S, Celebioglu A, Uyar T. Surface modification of electrospun cellulose acetate nanofibers via RAFT polymerization for DNA adsorption. *Carbohydr. Polym.* 2014;113: 200–207.
- [239] Bhattacharya A, Misra BN. Grafting: a versatile means to modify polymers: techniques, factors and applications. *Prog. Polym. Sci.* 2004;29: 767–814.
- [240] Kayaci F, Aytac Z, Uyar T. Surface modification of electrospun polyester nanofibers with cyclodextrin polymer for the removal of phenanthrene from aqueous solution. *J. Hazard. Mater.* 2013;261: 286–294.
- [241] Lin YF, Ye Q, Hsu SH, Chung TW. Reusable fluorocarbon-modified electrospun PDMS/PVDF nanofibrous membranes with excellent CO₂ absorption performance. *Chem. Eng. J.* 2016;284: 888–895.
- [242] Chang Z, Xu Y, Zhao X, Zhang Q, Chen D. Grafting Poly(methyl methacrylate) onto Polyimide Nanofibers via “Click” Reaction. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2009;1: 2804–2811.
- [243] Lin F, Yu J, Tang W, Zheng J, Xie S, Becker ML. Postelectrospinning “Click” modification of degradable amino acid-based poly(ester urea) nanofibers. *Macromolecules* 2013;46: 9515–9525.
- [244] Zheng J, Hua G, Yu J, Lin F, Wade MB, Reneker DH, Becker ML. Postelectrospinning “Triclick” functionalization of degradable polymer nanofibers. *ACS Macro Lett.* 2015;4: 207–213.
- [245] Ma Z, Ramakrishna S. Electrospun regenerated cellulose nanofiber affinity membrane functionalized with protein A/G for IgG purification. *J. Membr. Sci.* 2008;319: 23–28.
- [246] Li HY, Liu YL. Nafion-functionalized electrospun poly(vinylidene fluoride) (PVDF) nanofibers for high performance proton exchange membranes in fuel cells. *J. Mater. Chem. A* 2014;2: 3783–3793.
- [247] Jin SY, Kim MH, Jeong YG, Yoon YI, Park WH. Effect of alkaline hydrolysis on cyclization reaction of PAN nanofibers. *Mater. Des.* 2017;124: 69–77.
- [248] Zhou F, Jia X, Yang Y, Yang Q, Gao C, Zhao Y, Fan Y, Yuan Y. Peptidemodified PELCL electrospun membranes for regulation of vascular endothelial cells. *Mater. Sci. Eng. C* 2016 :68 : 623–631.
- [249] Ghasemi-Mobarakeh L, Prabhakaran MP, Morshed M, Nasr-Esfahani MH, Ramakrishna S. Bio-functionalized PCL nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* 2010;30: 1129–1136.
- [250] Wang S, Zhu J, Shen M, Zhu M, Shi X. Poly(amidoamine) dendrimer-enabled simultaneous stabilization and functionalization of electrospun poly(γ -glutamic acid) nanofibers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2014 :6 : 2153–2161.
- [251] Srisook T, Vongsetskul T, Sucharitakul J, Chaiyen P, Tangboriboonrat P. Immobilization of 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase onto functionalized electrospun polycaprolactone ultrafine fibers: a novel heterogeneous catalyst. *React. Funct. Polym.* 2014;82: 41–46.
- [252] Lu PP, Xu ZL, Yang H, Wei YM. Processing–structure–property correlations of polyethersulfone/perfluorosulfonic acid nanofibers fabricated via electrospinning from polymer-nanoparticle suspension. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2012;4: 1716–1723.
- [253] Fu Y, Liu L, Zhang L, Wang W. Highly conductive one-dimensional nanofibers: silvered electrospun silica nanofibers via poly(dopamine) functionalization. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2014;6: 5105–5112.
- [254] Nejad AG, Unnithan AR, Sasikala ARK, Samarikhajaj M, Thomas RG, Jeong YY, Nasser S, Murugesan P, Wu D, Hee Park C, Kim CS. Mussel-inspired electrospun nanofibers functionalized with size-controlled silver nanoparticles for wound dressing application. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2015;7: 12176–12183.
- [255] Amarjargal A, Tijing LD, Shon HK, Park CH, Kim CS. Facile in situ growth of highly monodispersed Ag nanoparticles on electrospun PU nanofiber membranes: flexible and high efficiency substrates for surface enhanced Raman scattering. *Appl. Surf. Sci.* 2014;308: 396–401.
- [256] Nie D, Han Z, Yu Y, Shi G. Composites of multiwalled carbon nanotubes/ polyethyleneimine (MWCNTs/PEI) and molecularly imprinted polymers for dinitrotoluene recognition. *Sens. Actuat. B* 2016;224: 584–591.
- [257] Shao D, Wei Q, Zhang L, Cai Y, Jiang S. Surface functionalization of carbon nanofibers by sol-gel coating of zinc oxide. *Appl. Surf. Sci.* 2008;254: 6543–6546.
- [258] Migonney V, H elary G and Noirclere F. Method for grafting bioactive polymers on prosthetic materials. WO patent 2007/141460 A3, 2006.
- [259] Amokrane G, Hocini A, Ameyama K, Dirras G, Migonney V, Falentin-Daudre C. Functionalization of New Biocompatible Titanium Alloys with Harmonic Structure Design by Using UV Irradiation. *IRBM* 2017;38: 190-197.
- [260] Chouirfa H, Migonney V, Falentin-Daudr e C. Grafting bioactive polymers onto titanium implants by UV irradiation. *RSC Advances* 2016;6: 13766-13771.

- [261] Chourifa H, Evans MDM, Bean P, Saleh-Mghir A, Crémieux AC, Castner DG, Falentin-Daudré C, Migonney V. Grafting of Bioactive Polymers with Various Architectures: A Versatile Tool for Preparing Antibacterial Infection and Biocompatible Surfaces. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2018;10: 1480-1491.
- [262] Héлары G, Noirclere F, Mayingi J, Migonney V. A new approach to graft bioactive polymer on titanium implants: Improvement of MG 63 cell differentiation onto this coating, *Acta. Biomater.* 2009;5: 124-133.
- [263] Héлары G, Noirclere F, Mayingi J, Bacroix B, Migonney V. A bioactive polymer grafted on titanium oxide layer obtained by electrochemical oxidation. Improvement of cell response. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 2010;21: 655-663.
- [264] Felgueiras H, Migonney V. Sulfonate groups grafted on Ti6Al4V favor MC3T3-E1 cell performance in serum free medium conditions: *Mater. Sci. Eng. C.* 2014;39: 196-202.
- [265] Vasconcelos DM, Falentin-Daudré C, Blanquaert D, Thomas D, Granja PL, Migonney V. Role of protein environment and bioactive polymer grafting in the *S. epidermidis* response to titanium alloy for biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C.* 2014;45: 176-183.
- [266] Falentin-Daudre C, Migonney V, Chourifa H, Baumann JS. Procédé de greffage de polymères bioactifs sur des matériaux métalliques, FR patent, 15 57621, 2015. (Extension PCT submitted: 8 août 2016, n° PCT/EP2016/068909).
- [267] Felgueiras H, Ben Aissa I, Evans MDM, Migonney V. Contributions of adhesive proteins to the cellular and bacterial response to surfaces treated with bioactive polymers: case of poly(sodium styrene sulfonate) grafted titanium surfaces, *Mater. Med.* 2015;26: 1-14.
- [268] Pavon-Djavid G, Gamble LJ, Ciobanu M, Gueguen V, Castner DG, Migonney V. Bioactive Poly(ethylene terephthalate) Fibers and Fabrics: Grafting, Chemical Characterization, and Biological Assessment. *Biomacromolecules* 2007;8: 3317-3325.
- [269] Viateau V, Zhou J, Guérard S, Manassero M, Thourot M, Anagnostou F, Mitton D, Brulez B, Migonney V. Ligart: Synthetic « bioactive » and « biointégrable » ligament allowing a rapid recovery of patients: chemical grafting, in vitro and in vivo biological evaluation, animal experiments, preclinical study. *IRBM* 2011;32: 118-122.
- [270] Vaquette C, Viateau V, Guérard S, Anagnostou F, Manassero M, Castner DG, Migonney V. The effect of polystyrene sodium sulfonate grafting on polyethylene terephthalate artificial ligaments on in vitro mineralisation and in vivo bone tissue integration. *Biomaterials* 2013;34: 7048-7063.
- [271] Huot S, Rohman G, Riffault M, Pinzano A, Grossin L, Migonney V. Increasing the bioactivity of elastomeric poly(ϵ -caprolactone) scaffolds for use in tissue engineering. *Bio-Med. Mater. and Eng.* 2013;23: 281-288.
- [272] Rohman G, Huot S, Vilas-Boas M, Radu-Bostan G, Castner DG, Migonney V. The grafting of a thin layer of poly(sodium styrene sulfonate) onto poly(ϵ -caprolactone) surface can enhance fibroblast behavior. *J. Mater. Sci. : Mater. Med.* 2015;26: 1-10.
- [273] Leroux A, Egles C, Migonney V. Impact of chemical and physical treatments on the mechanical properties of poly(ϵ -caprolactone) fibers bundles for the anterior cruciate ligament reconstruction. *PLoS ONE* 2018;13: e0205722.
- [274] Leroux A, Maurice E, Viateau V, Migonney V. Feasibility Study of the Elaboration of a Biodegradable and Bioactive Ligament Made of Poly(ϵ -caprolactone)-pNaSS Grafted Fibers for the Reconstruction of Anterior Cruciate Ligament: In Vivo Experiment. *IRBM* 2019;40: 38-44.
- [275] Venkatesan JK, Leroux A, Baumann JS, Rey-Rico A, Falentin-Daudré C, Frisch J, Madry H, Migonney V, Cucchiari M. Genetic modification of human bone marrow aspirates via delivery of rAAV vectors coated on pNaSS-grafted poly(ϵ -caprolactone) scaffolds. *Osteoarthritis and Cartilage* 2018;26: 134-135.
- [276] Woodruff MA, Huttmacher DW. The Return of a Forgotten Polymer—Polycaprolactone in the 21st Century. *Progress in Polymer Science* 2010;35: 1217–1256.
- [277] Huang YT, Wang WC, Hsu CP, Lu WY, Chuang WJ, Chiang MY. The ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone and l-lactide using aluminum complexes bearing benzothiazole ligands as catalysts. *Polym. Chem.* 2016;7: 4367–4377.
- [278] Malikmammadov E, Tanir TE, Kiziltay A, Hasirci V, Hasirci N.(2017): PCL and PCL-Based Materials in Biomedical Applications, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2017: DOI: 10.1080/09205063.2017.1394711.
- [279] Herman MF. Tissue Engineering, in *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2007: 1259.
- [280] Yildirim L and Seifalian AM. Three-dimensional biomaterial degradation – Material choice, design and extrinsic factor considerations. *Biotechnol Adv* 2014;32: 984–999.

- [281] Abedalwafa M, Wang F, Wang L, Li C. Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: A review. *Rev Adv Mater Sci* 2013;34: 123–140.
- [282] Gleadall A, Pan J, Kruft MA, Kellomäki M. Degradation mechanisms of bioresorbable polyesters. Part 1. Effects of random scission, end scission and autocatalysis. *Acta Biomater* 2014;10: 2223–2232.
- [283] Gleadall A, Pan J, Kruft MA, Kellomäki M. Degradation mechanisms of bioresorbable polyesters. Part 2. Effects of initial molecular weight and residual monomer. *Acta Biomater* 2014;10: 2233–2240.
- [284] Martins AM, Pham QP, Malafaya PB, Sousa R, Gomes ME, Raphael RM. The role of lipase and alpha-amylase in the degradation of starch/poly(epsilon-caprolactone) fiber meshes and the osteogenic differentiation of cultured marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A* 2009;15: 295–305.
- [285] Hernández AR, Contreras OC, Acevedo JC, Moreno LGN. Poly(epsilon-caprolactone) degradation under acidic and alkaline conditions. *Am J Polym Sci* 2013;3: 70–75.
- [286] Edlund U and Albertsson AC. Degradable polymer microspheres for controlled drug delivery. *Degrad Aliphatic Polyesters* 2002;157: 67–112.
- [287] Migonney V. Synthetic and natural degradable polymers, in *Biomaterials*, V. Migonney. ed., Hoboken, NJ, 2014: 59.
- [288] Xu FJ, Wang ZH and Yang WT. Surface functionalization of polycaprolactone films via surface-initiated atom transfer radical polymerization for covalently coupling cell adhesive biomolecules. *Biomaterials* 2010;31: 3139–3147.
- [289] Shah LK and Amiji MM. Intracellular delivery of saquinavir in biodegradable polymeric nanoparticles for HIV/AIDS. *Pharm Res* 2006;23: 2638–2645.
- [290] Scofield JH. Hartree-Slater Subshell Photoionization Cross-Sections at 1254 and 1487eV. *J. Elec. Spectrosc. Relat. Phenom.* 1976;8: 129–137.
- [291] Kweon HY, Yoo MK, Park IK, Kim TH, Lee HC, Lee HS, Oh JS, Akaike T, Cho CS. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. *Biomaterials*, 2003, 24, 801–8.
- [292] Zhang Y, Lim CT, Ramakrishna S, Huang ZM. Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. *J Mater Sci Mater Med* 2005;16: 933–46.
- [293] Carnegie JA, Cabaca O. Extracellular matrix composition and resilience. Two parameters that influence the in vitro migration and morphology of rat inner cell mass-derived cells. *Biol Reprod* 1993;48: 287–99.
- [294] Tan EPS, Ng SY, Lim CT. Tensile testing of a single ultrafine polymeric fiber. *Biomaterials* 2005 :26: 1453–6.
- [295] Tan EPS, Goh CN, Sow CH, Lim CT. Tensile test of a single nanofiber using an atomic force microscope tip. *Appl Phys Lett* 2005;86. 073115/1-3.
- [296] El Khadali F, HéLary G, Pavon-Djavid G, Migonney V. Modulating fibroblast cell proliferation with functionalized poly (methyl methacrylate) based copolymers: chemical composition and monomer distribution effect. *Biomacromolecules* 2002;3: 51-56.
- [297] Anagnostou F, Debet F, Pavon-Djavid G, Goudaby Z, HéLary G, Migonney V. Osteoblast functions on functionalized PMMA-based polymers exhibiting *Staphylococcus aureus* adhesion inhibition. *Biomaterials* 2006;27: 3912-3919.
- [298] Poussard L, Ouédraogo CP, Pavon-Djavid G, Migonney V. Inhibition of *Staphylococcus epidermidis* adhesion on titanium surface with bioactive water-soluble copolymers bearing sulfonate, phosphate or carboxylate functions. *Pathologie Biologie* 2012;60: 84-90.
- [299] Goddard JM, Hotchkiss JH. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Prog. Polym. Sci.* 2007;32: 698-725.
- [300] Situma C, Wang Y, Hupert M, Barany F, McCarley RL, Soper SA. Fabrication of DNA microarrays onto poly (methyl methacrylate) with ultraviolet patterning and microfluidics for the detection of low-abundant point mutations. *Anal. Biochem.* 2005;340: 123-135.
- [301] Song YW, Do HS, Joo HS, Lim DH, Kim S, Kim HJ. Effect of grafting of acrylic acid onto a PET film surfaces by UV irradiation on the adhesion of PSAs. *J. Adhes. Sci. Technol.* 2006;20: 1357-1365.
- [302] Zhao X, Xiong D, Wang K, Wang N. Improved biotribological properties of PEEK by photo-induced graft polymerization of acrylic acid. *Mater. Sci. Eng. C.* 2017;75: 777-783.
- [303] Nahar P, Naqvi A, Basir SF. Sunlight-mediated activation of an inert polymer surface for covalent immobilization of a protein, *Anal. Biochem.* 2004;327: 162-164.
- [304] Welle A, Horn S, Schimmelpfeng J, Kalka D. Photo-chemically patterned polymer surfaces for controlled PC-12 adhesion and neurite guidance, *J. Neurosci. Meth.* 2005;142: 243-250.

- [305] Xing CM, Deng JP, W.T. Yang WT. Synthesis of Antibacterial Polypropylene Film with Surface Immobilized Polyvinylpyrrolidone-Iodine Complex. *J. Appl. Polym. Sci.* 2005;97: 2026-2031.
- [306] Yuan Y, Lee TR. Contact Angle and Wetting Properties. In: BRACCO G, Holst B, editors. *Surface Science Techniques*. Springer Series in Surface Sciences 2013: 3-34.
- [307] Deng L, Wang L, Liu L, Yang W. Developments and new applications of UV-induced surface graft polymerizations. *Prog. Polym. Sci.* 2009;34: 156-193.
- [308] Gutiérrez-Villarreal MH, Guzmán-Moreno JG. Surface graft polymerization of N-vinylcaprolactam onto polylactic acid film by UV irradiation. *J. Polym. Res.* 2013;20: 1-6.
- [309] Gijssman P, Meijers G, Vitarelli G. Comparison of the UV-degradation chemistry of polypropylene, polyethylene, polyamide 6 and polybutylene terephthalate. *Polym. Degrad. Stab.* 1999;65: 433-441.
- [310] Amokrane G, Falentin-daudré C, Ramtani S, Migonney V. A simple method to functionalize PCL surface by grafting bioactive polymers using UV irradiation. *IRBM* 2018;39: 268-278.
- [311] Sunandhakumari VJ, Vidhyadharan AK, Alim A, Kumar D, Ravindran J, Krishna A, Prasad M. Fabrication and In Vitro Characterization of Bioactive Glass/Nano Hydroxyapatite Reinforced Electrospun Poly(ϵ -Caprolactone) Composite Membranes for Guided Tissue Regeneration. *Bioengineering* 2018;5: 54.
- [312] David RT, Roberts and Holder SJ. Mechanochromic systems for the detection of stress, strain and deformation in polymeric materials. *J. Mater. Chem.* 2011 :21 : 8256.
- [313] Moroni L, De Wijn JR, Van Blitterswijk CA. 3D-fiber deposited scaffolds for tissue engineering : influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties. *Biomaterials* 2006;27: 974-985.
- [314] Li S, M. Vert M. Biodegradation of aliphatic polyester, Degradable polymers principles and applications. Chapman & Hall Edts 1995, Chap 5, 43-87.
- [315] Göpferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 1996;17: 103-114.
- [316] Pitt CG, Gratzel MM, Kimmel GL. Aliphatic polyesters. 2. The degradation of poly(DL-lactide), poly(ϵ -caprolactone) and their copolymers in vivo. *Biomaterials* 1981;2: 215-220.
- [317] Leray J, Vert M, Blanquaert D. Nouveau matériau de prothèse osseuse et son application. *French Patent Appl.* 1976 :76 : 281,63.
- [318] Ginde R, Gupta RK. In vitro degradation of poly(glycolic acid) pellets and fibres. *J. Appl. Polym. Sci.* 1987;33: 2411-2429.
- [319] Løvdal A, Vange J, Nielsen LF, Almdal K. Mechanical properties of electrospun PCL scaffold under in vitro and accelerated conditions. *Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications.* 2014;26 : 1450043.
- [320] Bonnet F. La régénération osseuse guidée : zones postérieures maxillaire et mandibulaire. *L'Information Dentaire* 2011;93: 20-23.
- [321] Kuo SM, Chang SJ, Chen TW, Kuan TC. Guided tissue regeneration for using a chitosan membrane: an experimental study in rats. *J Biomed Mater Res Part A* 2006 :76: 408e15.
- [322] Wikesjö UM, Lim WH, Thomson RC, Hardwick WR. Periodontal repair in dogs: gingival tissue occlusion, a critical requirement for GTR?. *J Clin Periodontol.* 2003;30: 655-664.
- [323] Babo PS, Pires RL, Reis RL and Gomes ME. Membranes for periodontal tissues regeneration. *Ciência & Tecnologia dos Materiais* 2015;27: 01-80.
- [324] Gentile P, Chiono V, Tonda-Turo C, Ferreira AM, Ciardelli G. Polymeric membranes for guided bone regeneration. *Biotechnol J* 2011;6: 1187e97.
- [325] Bergsma J, Bruijn WD, Rozema F, Bos R, Boering G. Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials* 1995;16: 25e31.
- [326] Shi R, Xue J, He M, Chen D, Zhang L, Tian W. Structure, physical properties, biocompatibility and in vitro/vivo degradation behavior of anti-infective polycaprolactone-based electrospun membranes for guided tissue/bone regeneration. *Polymer Degradation and Stability* 2014;109: 293e306
- [327] Fujihara K, Kotaki M, Ramakrishna S. Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers. *Biomaterials* 2005;26: 4139e47.
- [328] Yang F, Both SK, Yang X, Walboomers XF, Jansen JA. Development of an electrospun nano-apatite/PCL composite membrane for GTR/GBR application. *Acta Biomater* 2009;5: 3295e304.
- [329] Ura PD, Karbowniczek JE, Szewczyk PK, Metwally S, Kopyscianski M, Stachewicz U. Cell Integration with Electrospun PMMA Nanofibers, Microfibers, Ribbons, and Films: A Microscopy Study. *Bioengineering* 2019;6: 41.

- [330] Bacakova L, Filova E, Kubies D, Machova L, Proks V, Malinova V, et al. Adhesion and growth of vascular smooth muscle cells in cultures on bioactive RGD peptidecarrying polylactides. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18: 1317-23.
- [331] Sunandhakumari VJ, Vidhyadharan AK, Alim A, Kumar D, Ravindran J, Krishna A, Prasad M, Fabrication and In Vitro Characterization of Bioactive Glass/Nano Hydroxyapatite Reinforced Electrospun Poly(ϵ -Caprolactone) Composite Membranes for Guided Tissue Regeneration. *Bioengineering* 2018;5: 54.
- [332] Straface E, Natalini B, Monti D, Franceschi C, Schettini G, Bisaglia M, et al. C3-fullerotrismethanodicarboxylic acid protects epithelial cells from radiation-induced anoikia by influencing cell adhesion ability. *FEBS Lett* 1999;454: 335–40.
- [333] Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE. Micropatterned surfaces for control of cell shape, position, and function. *Biotechnol Prog* 1998;14: 356–63.
- [334] Huang S, Ingber DE. Shape-dependent control of cell growth, differentiation, and apoptosis: switching between attractors in cell regulatory networks. *Exp Cell Res* 2000;261: 91–103.
- [335] Bacakova L, Filova E, Rypacek F, Svorcik V, Stary V. Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiol Res* 2004;53: S35–45.
- [336] Bacakova L, Filova E, Parizek M, Ruml T, Svorcik V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants, *Biotechnology Advances* 2011;29: 739-769.
- [337] Filova E, Bullett NA, Bacakova L, Grausova L, Haycock JW, Hlucilova J, et al. Regionally selective cell colonization of micropatterned surfaces prepared by plasma polymerization of acrylic acid and 1,7-octadiene. *Physiol Res* 2009;58: 669–84.
- [338] Keselowsky BG, Collard DM, García AJ. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Biomed Mater Res A* 2003;66:247–59.

Liste d'activité

Gana Amokrane

LBPS, CNRS (UMR 7244), Institut Galilée, 93430 Villetaneuse, France

Publications dans des journaux à comité de lecture :

Amokrane G, Hocini A, Ameyama K, Dirras G, Migonney V, Falentin-Daudre C. Functionalization of New Biocompatible Titanium Alloys with Harmonic Structure Design by Using UV Irradiation. *IRBM* 2017;38: 190–197.

Amokrane G, Falentin-Daudré C, Ramtani S, Migonney V. A Simple Method to Functionalize PCL Surface by Grafting Bioactive Polymers Using UV Irradiation. *IRBM* 2018;39: 268–278.

Amokrane G, Jubeli E, Yagoubi N, Humblot V, Ramtani S, Migonney V, Falentin-Daudre C. Electrospun poly(ϵ -caprolactone) fiber scaffolds functionalized by the covalent grafting of a bioactive polymer: Surface characterization and influence on *in vitro* biological response. *ACS Omega*. Sous presse.

Conférences nationales et internationales:

Communications orales :

Nationales :

Amokrane G*, Hocini A, Ameyama K, Dirras G, Migonney V, Falentin-Daudre C, *Elaboration, microstructure, propriétés mécaniques et fonctionnalisation de nouveaux alliages de titane biocompatibles*, Recherche en Imagerie et Technologies pour la Santé (RITS), Lyon, 27-29 Mars 2017.

Amokrane G*, Falentin-daudre C, Ramtani S, Migonney V, *Préparation, par électrofilage, d'un nouvel implant PCL biodégradable et fonctionnalisé pour des applications biomédicales*, GDR Bio-Ingénierie des Interfaces (GRD-B2i), Paris, 06 Avril 2018.

Internationales :

Amokrane G*, Falentin-daudre C, Ramtani S, Migonney V, *Development of a New Functionalized and Biodegradable Electrospun Implant for Biomedical applications*, *Polymers and Organic Chemistry (POC)*, Palavas les flots, 03-07 Juin 2018.

Amokrane G*, Jubeli E, Yagoubi N, Humblot V, Ramtani S, Migonney V, Falentin-Daudre C, *Influence of the covalent grafting of bioactive polymers onto PCL fiber scaffolds: Surface characterization, intrinsic properties investigation and biological response*, Canadian Biomaterials Society (CBS), Quebec city, 21-24 Mai 2019.

* Personne qui a communiqué

Posters:

Amokrane G, Falentin-Daudre C, Hocini A, Ameyama K, Migonney V, Dirras G, *Elaboration, microstructure, propriétés mécaniques et fonctionnalisation de nouveaux alliages de titane biocompatibles*, Paris, GDR-B2i 2016.

Amokrane G, Falentin-Daudre C, Migonney V, Ramtani S, *Développement d'un nouvel implant PCL électrospinné biodégradable et fonctionnalisé pour des applications biomédicales*, Lyon, RITS 2017.

Amokrane G, Falentin-Daudre C, Migonney V, Ramtani S, Development of a new electrospun PCL biodegradable and functionalized implant for biomedical applications, Villetaneuse, journée scientifique de l'école doctorale Galilée 2018.

Amokrane G, Falentin-Daudre C, Migonney V, Ramtani S, Développement d'un nouvel implant PCL électrospinné biodégradable et fonctionnalisé pour des applications biomédicales, Bobigny, Matériaux Hybrides : de la conception chimique à l'application biomédicale 2019.

Résumé:

L'électrofilage, une technique pour la fabrication électrostatique de fibres, a suscité un intérêt croissant ces dernières années en raison de sa polyvalence et de son potentiel d'application dans divers domaines, notamment en ingénierie tissulaire. Le polymère polycaprolactone (PCL) a été approuvé pour une application biomédicale et offre d'excellentes propriétés mécaniques et une biodégradation lente, ce qui en fait un matériau approprié pour une utilisation comme échafaudage pour l'ingénierie tissulaire. Des études antérieures réalisées dans notre laboratoire ont montré que le greffage covalent (méthode "Grafting From") de polymères ou copolymères bioactifs permet de surmonter l'hydrophobicité du PCL et peut favoriser l'adhésion et la différenciation cellulaire sur les échafaudages.

Différents échafaudages en fibres PCL avec différentes microstructures ont été préparés par électrofilage. Le greffage de polymères bioactifs sur ces échafaudages a été réalisé en utilisant deux techniques de "grafting from" ; (i) le greffage par voie thermique pendant 1 ou 3 h qui nécessite une activation de surface par ozonation comme référence et (ii) le greffage UV pendant 1 heure avec ou sans activation de surface. Nous avons comparé ces techniques de greffage en termes de modification de surface, d'effets du processus de greffage sur les propriétés intrinsèques du PCL. Des essais *in vitro* ont été réalisés pour observer le comportement des cellules fibroblastiques sur divers échafaudages fonctionnalisés présentant différents degrés d'hydrophilie de surface et les comparer entre eux, ainsi qu'à des échafaudages non greffés.

La réussite du greffage de polymères ioniques sur les échafaudages en fibres PCL a été démontrée à l'aide de diverses techniques de caractérisation de surface. Les modifications possibles des propriétés intrinsèques du PCL ont été étudiées par caractérisation mécanique, chromatographie d'exclusion stérique (SEC) et calorimétrie différentielle à balayage (DSC). Enfin, la biodégradation de ces échafaudages, à différents temps, a été évaluée dans différents milieux.

Cette étude montre l'élaboration de différents échafaudages en fibre PCL, leur fonctionnalisation par greffage polymères bioactifs et l'appréciation des changements mécaniques et microstructuraux. Les essais biologiques *in vitro* ont montré l'effet favorable du polymère greffé sur la réponse cellulaire et que selon le type de microstructure de l'échafaudage, sa fonctionnalisation de surface par des polymères bioactifs et son hydrophilie de surface, différents comportements cellulaires peuvent être observés.

Mots clés:

Électrofilage, polymères bioactifs, grafting from, irradiations UV, échafaudage en PCL, ingénierie tissulaire

Abstract:

Electrospinning, an electrostatic fiber fabrication technique has evinced more interest in recent years due to its versatility and potential for applications in diverse fields especially in tissue engineering. Polycaprolactone (PCL) polymer has been approved for biomedical application and offers excellent mechanical properties and slow biodegradation, making it an appropriate material for use as a scaffold for tissue engineering. Previous studies carried out in our laboratory have shown that the covalent direct grafting ("Grafting From" method) of bioactive polymers or copolymers allows to overcome the PCL hydrophobicity and can favor cell adhesion and differentiation onto scaffolds.

Various PCL scaffolds with different microstructures were prepared by electrospinning. The grafting of bioactive polymers on PCL electrospun scaffolds was carried out using two "grafting from" techniques; (i) the thermal grafting for 1 or 3 hours which requires a surface activation by ozonation as reference and (ii) the UV grafting for 1 hour with or without surface activation. We compared these grafting techniques in terms of surface modification, effect of the grafting processes on the intrinsic PCL properties. *In vitro* assay experiments were carried out to observe the fibroblast cell behavior on various functionalized scaffolds exhibiting different degrees of surface hydrophilicity and compare them to each other as well as an ungrafted scaffold.

The successful grafting of ionic polymers onto the grafted PCL scaffolds was demonstrated using surface characterization techniques. Possible changes in the intrinsic properties of PCL have been studied using mechanical characterization, size exclusion chromatography (SEC), and differential scanning calorimetry (DSC). Finally, the biodegradation at different time-points of these scaffolds was evaluated in different environments.

This study shows the elaboration of various PCL fiber scaffolds, their functionalization by the grafting of bioactive polymers and the appreciation of the mechanical and microstructural changes. The *in vitro* biological assays have shown the favorable effect of the grafted polymer on the cellular response and that, depending on the microstructure type of the scaffold, its surface functionalization by bioactive polymers and its surface hydrophilicity, different cell behaviors can be observed.

Keywords:

Electrospinning, bioactive polymers, grafting from, UV irradiation, PCL scaffold, tissue engineering